UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação do perfil imunomodulador de frações polissacarídicas
não-amido isoladas de banana

Marcelo Sansone

Tese para obtenção de título de doutor

Orientador: Prof. Dr. João Roberto
Oliveira do Nascimento

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

MARCELO SANSONE

Avaliação do perfil imunomodulador de frações polissacarídicas
não-amido isoladas de banana

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese apresentada ao Departamento de
Alimentos e Nutrição Experimental da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências dos Alimentos.

Área de Concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Dr. João Roberto
Oliveira do Nascimento

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sansone, Marcelo
S229a Avaliação do perfil imunomodulador de frações polissacarídicas
não-amido isoladas de banana. -- São Paulo, 2017.
138p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Polissacarídeos : Ciência dos alimentos 2. Banana 3. Cultura
de células 4. Macrófagos 5. Monócitos I. T. II. Nascimento, João
Roberto Oliveira do, orientador.

641.13

CDD

MARCELO SANSONE

Avaliação do perfil imunomodulador de frações polissacarídicas
não-amido isoladas de banana

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Orientador/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, 25 de abril de 2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, família, professores e amigos que me acompanham nessa jornada e me conduziram até aqui.

Ao meu amado pai Francesco Sansone, que me criou com honestidade, integridade e muito amor sendo um dos grandes responsáveis pelo meu crescimento como ser humano, obrigado por sempre estar presente em minha vida.

Aos meus queridos e saudosos avós *in memoriam*, Antônio José Zanoni e Giuseppe Sansone. Como queria dividir esse momento e ganhar um beijo de vocês! Amo vocês eternamente, obrigado por todos os ensinamentos.

À minha amada esposa Ana Cláudia, sem você não estaria onde estou hoje. Obrigado pelo seu apoio, paciência, amor e carinho incondicionais durante esses 15 anos.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores do departamento de Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental que estiveram de alguma forma envolvidos nesse projeto.

Aos professores que fizeram parte da minha formação desde o início e permitiram meu crescimento profissional.

Aos alunos que me estimularam nas horas mais complicadas, minha gratidão é eterna.

A minha esposa e pós-doutoranda Ana Cláudia, que realizou todos os ensaios envolvendo citometria de fluxo.

Aos pesquisadores que de alguma forma contribuíram para minhas dúvidas e dilemas durante o doutorado e me mostraram novos caminhos.

Aos os técnicos de laboratório pelo empenho, ajuda e dedicação conosco, em especial Dra. Tania Shiga, que foi minha mentora no mundo dos carboidratos.

Ao Prof. Giorgio Trinchieri, que com apenas uma aula, foi capaz de mudar minha visão e me nortear para um objetivo maior.

Ao meu orientador, que com sua paciência, conseguiu conduzir nosso trabalho até o fim, agradeço pelas lições aprendidas.

Ao CNPq que financiou minha bolsa e as agências de fomento envolvidas que tornaram esse projeto possível.

Muito obrigado.

“Novos começos sempre chegam,
muitas vezes, disfarçados de
desfechos difíceis.”

Lao Tzu

RESUMO

SANSONE, M. **Avaliação do perfil imunomodulador de frações polissacarídicas não-amido isoladas de banana.** 2017. 138F. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os alimentos desempenham papel fundamental na nutrição e também na imunidade, pois podem conter substâncias que interagem direta ou indiretamente com o sistema imune, principalmente o de mucosas. Alguns polissacarídeos não-amido (PNAs) originados de plantas, algas e fungos comestíveis podem modular a função imune, contribuindo para a manutenção da saúde. A banana apresenta composição monossacarídica da parede celular similar à de plantas com efeitos imunomoduladores, permitindo formular a hipótese de que os PNAs dessa fruta também tenham essas propriedades. Assim, o objetivo foi extrair, purificar e caracterizar PNAs hidrossolúveis da polpa de banana das cultivares Nanicão e Thap Maeo e testá-los em cultivos de macrófagos RAW 267.4, células THP-1, macrófagos diferenciados por PMA THP-1 e células HL-60 *in vitro* avaliando a ação imunomoduladora através da dosagem de citocinas, NO e ensaios de fagocitose. As frações hidrossolúveis foram caracterizadas quanto ao seu conteúdo monossacarídico e ligações por hidrólise enzimática, identificando homogalacturonanos, mananos, arabinogalactanos, xilogalacturonanos e galactoglucomananos. As frações foram testadas para ausência de endotoxinas e viabilidade celular por MTT. Foram estabelecidas as doses não-tóxicas e ensaiadas as concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ das frações polissacarídicas para os testes *in vitro*. Não houve toxicidade para macrófagos e monócitos, enquanto que para a linhagem de células pro-mielocíticas de leucemia humana HL-60, as frações se mostraram citotóxicas. Houve aumento de atividade fagocítica nas frações WSP, UFP e HTP quando comparadas ao controle negativo de células, assim como a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-6, além da quimiocina IL-8 nas células oriundas de THP-1 e diminuição nos marcadores TLR-2 com aumento de CD14 nas células THP-1, além do aumento do tamanho celular promovido pelas frações polissacarídicas mostrando diferenciação para série granulocítica. Portanto, PNAs de ambas as cultivares de banana possuem potencial imunomodulador seja inflamatório, anti-inflamatório ou de diferenciação de células THP-1 imaturas *in vitro*.

Palavras-chave: banana, polissacarídeos não-amido, imunomodulação, macrófagos, monócitos.

ABSTRACT

SANSONE, M. **Evaluation of the immunomodulatory profile of non-starch polysaccharide fractions isolated from banana.** 2017. 138F. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Food plays a major role in nutrition as in immunity, as they may contain substances that interact directly or indirectly with the immune system, especially those located on mucous membranes. Some non-starch polysaccharides (NSPs) originate from plants, algae, and edible fungi can modulate immune function, contributing to the maintenance of health. The banana presents cell wall monosaccharide composition like the other plant polysaccharides with immunomodulatory effects allowing to formulate the hypothesis that this fruit NSPs also have these properties. The objective was to extract, purify and characterize water-soluble banana pulp NSPs of Nanicão and Thap Maeo cultivars and test them *in vitro* on cell lineages of RAW 267.4 macrophages, PMA differentiated THP-1 macrophages, THP-1 monocytes, and HL-60, evaluating their immunomodulatory action by the dosage of cytokines, NO and phagocytosis assays. Water-soluble fractions were characterized as to their content and monosaccharide linkages by enzymatic hydrolysis, identifying homogalacturonans, mannans, arabinogalactans, xylogalacturonan, and galactoglucomannans in its composition. Fractions were tested for the absence of endotoxins and cell viability by MTT. Non-toxic concentrations doses of 10, 50 and 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ of the polysaccharide fractions were established for *in vitro* testing. The NSPs fractions WSP, UFP, and HTP tested promoted an increase in phagocytic activity in THP-1 PMA derived macrophages compared to negative control cells, as well as the production of inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α , IL-6. An increase in the THP-1 CD14 cell receptor and decrease in CD33, CD123, CD11c and TLR-2 receptors were promoted by the banana polysaccharides. Besides, there was an increase in cell size showing cell differentiation towards granulocyte line and demonstrating that NSPs from both cultivars were immunomodulatory with a capacity of immature cell differentiation and proving that *in vitro* screening test is an efficient method to test other foodborne substances with immunomodulatory potential.

Keywords: banana, non-starch polysaccharides, immunomodulation, macrophages, monocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Porcentagem molar de unidades de monossacarídeo encontrados em (A) polissacarídeo solúvel em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados e (C) polissacarídeos com tratamento térmico das bananas Nanicão e Thap Maeo. Açúcares neutros e ácidos foram determinados: arabinose (ARA), fucose (FUC), galactose (GAL), ácido galacturônico (GAL UA), glicose (GLC), manose (MAN), ramnose (RHA) e xilose (XYL). Os dados estão representados pela média $\pm$ erro padrão (n=9). O teste t de Student foi utilizado para determinar a significância estatística das diferenças entre os valores para as cultivares Nanicão e Thap Maeo. p-valor * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.005 , *** ≤ 0.0005 , **** ≤ 0.0001 . NS: não significativa.....50

Figura 2. Cromatograma da WSP obtida da cv Nanicão (A) e Thap Maeo (B) em coluna Sephacryl S-400. Foram aplicadas quantidades de amostra de 0,5 a 1,5 mg, de acordo com a viscosidade do material, em volume de injeção de 1ml. Como eluente foi utilizado tampão fosfato 0,05M, NaCl 0,15M e azida sódica 0,02M a um fluxo de 0,5 ml.min⁻¹.....53

Figura 3. Perfil cromatográfico dos oligômeros liberados por hidrólise enzimática dos polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) das bananas Nanicão e Thap Maeo. Alíquotas dos UFP foram submetidas a hidrólise enzimática com mannanase, endopoligalacturonase, arabinanase, xilanase e xiloglicanase e os perfis de oligômeros liberados após hidrólise foram analisados por HPAEC-PAD. A linha laranja corresponde ao perfil da amostra controle sem tratamento enzimático, enquanto a linha preta representa o perfil da amostra após o tratamento enzimático.....56

Figura 4. Perfil cromatográfico dos oligômeros liberados por hidrólise enzimática dos polissacarídeos tratados por processamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo. Alíquotas dos HTP foram submetidas a hidrólise enzimática com mannanase, endopoligalacturonase, arabinanase, xilanase e xiloglicanase e os perfis de oligômeros liberados após hidrólise foram analisados por HPAEC-PAD. A linha laranja corresponde ao perfil da amostra controle sem tratamento enzimático, enquanto a linha preta representa o perfil da amostra após o tratamento enzimático.....57

Figura 5. Teste de viabilidade de macrófagos RAW 264.7 tratados com PNAs de bananas. Os macrófagos foram incubados com apenas o meio de cultura (CTL) ou o meio de cultura adicionado de (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) nas bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ por 24 h (cinza claro) e 72 h (cinza escuro). A viabilidade abaixo de 90% nas primeiras 24 horas foi indicativo de efeito tóxico. Os dados estão representados pela média $\pm$ DP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05 , ** < 0.005 , *** < 0.0005 . NS: não significativa.....62

Figura 6. Teste de viabilidade de macrófagos diferenciados por 5 ng.ml⁻¹ PMA oriundos de monócitos THP-1 tratados com PNAs de bananas. Os macrófagos foram incubados com apenas o meio de cultura (CTL) ou o meio de cultura adicionado de (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) nas bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ por 24 h (cinza claro) e 72 h (cinza escuro). A viabilidade abaixo de 90% nas primeiras 24 horas foi indicativo de efeito tóxico. Os dados estão representados pela média $\pm$ DP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para

determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005. NS: não significante.....63

Figura 7. Teste de viabilidade de células HL-60 tratadas com PNAs de bananas. Os macrófagos incubados apenas com o meio de cultura (CTL) ou meio de cultura adicionado de 1 mg.ml⁻¹ de doxorubicina (DX), foram considerados controle negativo e positivo, respectivamente. Além disso, foi adicionado o meio de cultura aos (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) nas bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹ por 24 h (cinza claro) e 72 h (cinza escuro). A viabilidade abaixo de 90% nas primeiras 24 horas foi indicativo de efeito tóxico. Os dados estão representados pela média ± DP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005. NS: não significante.....64

Figura 8. Produção de TNF-α pelos macrófagos RAW 264.7 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± DP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....67

Figura 9. Produção de IL-6 pelos macrófagos RAW 264.7 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....68

Figura 10. Produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos RAW 264.7 incubados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9) expressos NO² mM. O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, **** <0.0001. NS: não significante.....69

Figura 11. Produção de IL-1β pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....71

Figura 12. Produção de IL-6 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.....72

Figura 13. Produção de IL-8 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.....73

Figura 14. Produção de IL-10 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.....75

Figura 15. Produção de IL-12p70 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.....77

Figura 16. Produção de TNF- α pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.....78

Figura 17. Produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9) expressos NO² mM. O teste t Student foi utilizado para

determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, **** <0.0001. NS: não significante.....80

Figura 18. Ensaio de inibição de produção de NO_2^- pelos macrófagos TPM através da incubação concomitante com 250 nM de acetato de N^G -Metil-L-Arginina com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9) expressos NO_2^- mM. O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, **** <0.0001. NS: não significante.....81

Figura 19. Produção de IL-1 β pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....84

Figura 20. Produção de IL-6 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....85

Figura 21. Produção de IL-8 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....87

Figura 22. Produção de IL-12p70 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....89

Figura 23. Produção de IL-10 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....90

Figura 24. Produção de TNF- α pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....92

Figura 25. Produção de óxido nítrico (NO) pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9) expressos NO² mM. O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....93

Figura 26. Ensaio de inibição de produção de NO²⁻ pelos monócitos THP-1 através da incubação concomitante com 250 nM de acetato de N^G-Metil-L-Arginina com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9) expressos NO² mM. NS: não significante.....94

Figura 27. Índice de Fagocitose dos macrófagos RAW 264.7 incubados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Alternativamente, os macrófagos foram incubados somente com meio de cultura mais partículas de zymosan (CTL) ou meio de cultura mais LPS constituindo os grupos controle negativo e positivo, respectivamente. Após 24 h, as partículas de zymosan foram adicionadas aos grupos controle e experimental e incubadas por 2 h adicionais. As células foram fixadas, coradas e as partículas fagocitadas foram visualizadas em microscópio óptico com aumento 400 x. O PI foi calculado assumindo o valor 0 para controle zymosan e 100 para o controle LPS. As barras negativas indicam inibição da fagocitose quando comparadas com o controle zymosan. Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.....96

Figura 28. Índice de Fagocitose dos macrófagos TPM incubados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Alternativamente, os macrófagos foram incubados somente com meio de cultura mais partículas de zymosan (CTL) ou meio de cultura mais LPS constituindo os grupos controle negativo e positivo, respectivamente. Após 24 h, as partículas de zymosan foram adicionadas aos grupos controle e experimental e incubadas por 2 h adicionais. As células foram fixadas, coradas e as partículas fagocitadas foram visualizadas em microscópio óptico com aumento 400 x. O PI foi calculado assumindo o valor 0 para controle zymosan e 100 para o controle LPS. As barras negativas indicam inibição da fagocitose quando comparadas com o controle zymosan. Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significativa.....98

Figura 29. Histograma de dispersão mostrando a análise do tamanho e complexidade das células THP-1 (2.10^5 células. ml^{-1}) sem tratamento e tratadas durante 24h em meio RPMI 1640 + 10% SFB suplementado com LPS (2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), GM-CSF (800 U. ml^{-1}) e as frações polissacarídicas WSP, UFP e HTP das cultivares Nanicao e Thap Maeo (200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) 102

Figura 30. Gráfico representando a média de intensidade de fluorescência (MFI) do parâmetro Forward Scatter Complexity (FSC) que mede o tamanho celular adquirido no *gate* da série granulocítica com 10.000 eventos contados por amostra (n=9). As células foram incubadas por 24h sendo as negativas THP-1 sem tratamento, e as tratadas com LPS (2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), GM-CSF (800 U. ml^{-1}) e as frações polissacarídicas WSP, UFP e HTP de ambas as cultivares Nanicao (N) e Thap Maeo (T) na concentração de 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Um aumento na intensidade desse parâmetro é indicativo do aumento da relação citoplasma/núcleo, demonstrando que as células estão saindo do estado indiferenciado para um mais maduro. A estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado comparando as frações testadas com o controle negativo. As barras horizontais representam a comparação pelo mesmo teste estatístico entre as cultivares Nanicao e Thap Maeo (n=9). p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significativa.....103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e seus ligantes principais. Adaptado de (LEUNG et al., 2006).....20

Tabela 2. Rendimento médio de extração de WSP e WIP a partir da polpa de banana das cultivares Nanicao e Thap Maeo congelada em nitrogênio líquido.....49

Tabela 3. Quantidades médias de polissacarídeos obtidas da ultrafiltração de WSP das cultivares Nanicao e Thap Maeo, com injeção de material inicial de 200 e 115 mg, respectivamente (n=3).....54

Tabela 4. Concentração de endotoxinas detectadas pelo KIT LAL LONZA nas frações de polissacarídeos na presença e na ausência de inibidor de β -glicanos.....59

Tabela 5. Porcentagem dos marcadores celulares expressos na superfície de células THP-1 cultivadas por 24h na presença das frações polissacarídicas WSP, UFP e HTP de ambas as cultivares na concentração de 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. O LPS (2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) foi utilizado como indutor de TLR-4, enquanto o GM-CSF (800 $\text{U}.\text{ml}^{-1}$) como marcador de proliferação de todos marcadores testados. Para o controle negativo foram utilizadas as células THP-1 cultivadas em meio completo somente. A estatística foi realizada aplicando o teste t Student não-pareado (n=3) tendo como referência o controle negativo e os valores estão representados em porcentagem de expressão de células marcadas dentro do *gate* de células viáveis e contados 10.000 eventos por amostra. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significativa.....100

LISTA DE ABREVIATURAS

API	Apiose
ARA	Arabinose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRMs	Modificadores de Resposta Biológica
CD	Marcador de Superfície Celular
CM	Meio Completo
COX-2	Ciclooxigenase-2
CR3	Receptor de Complemento 3
DB	Grau de Ramificação
DCs	Células dendríticas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Grau de Polimerização
FUC	Fucose
g	grama
GAL UA	Ácido Galacturônico
GAL	Galactose
GLC UA	Ácido Glicurônico
GLC	Glicose
GlcNAc	Acetilglicosamina
HG	Homogalacturonano
HPAEC-PAD	Cromatografia de troca aniônica de alta performance acoplada à detecção de pulso amperométrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão

HTP	Polissacarídeo solúvel em água ultrafiltrado ≥ 50 kDa tratado por processamento térmico
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMEM	<i>Iscove's Modified Eagle Medium</i>
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
kDa	quilo Daltons
L-NMA	N ^G -Metil-L-Arginina
LNT	Lentinano
LPS	Lipopolissacarídeo
MAN	Manose
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MBLs	Lectinas ligadoras de manose
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
MR	Receptor de manose
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
MW	Peso Molecular
N	cultivar Nanicação
NK	Linfócito T <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
NSPs	<i>Non-starch polysaccharides</i>
°C	graus Celsius

PAMPS	Padrões moleculares associados à patógenos
pg	picograma
PGE ₂	Prostaglandina-E2
PI	Índice de fagocitose
PMA	Phorbol 12-miristato 13-acetato
PNAs	Polissacarídeos não-amido
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
RG-I	Ramnogalacturonano tipo I
RG-II	Ramnogalacturonano tipo II
RHA	Ramnose
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
SFB	Soro Fetal Bovino
SR	Receptor <i>Scavenger</i>
T	cultivar Thap Maeo
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alpha
TPM	Macrófagos diferenciados por PMA (THP-1)
UFP	Polissacarídeo solúvel em água ultrafiltrado ≥ 50 kDa
WSP	Polissacarídeo solúvel em água
$\times g$	Aceleração gravitacional
XGA	Xilogalacturonano
XYL	Xilose
μg	micrograma
μl	microlitro

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Polissacarídeos Modificadores de Respostas Biológicas	3
1.2 Polissacarídeos BRM de plantas fotossintetizantes	3
1.3 Polissacarídeos BRMs de origem fúngica	5
1.4 Polissacarídeos BRM das algas	6
1.5 Principais polissacarídeos não-amido (PNAs) com potencial imunomodulador presentes em alimentos	8
1.5.1 Beta-glicanos	8
1.5.2 Arabinogalactanos	11
1.5.3 Arabinoxilanos	13
1.6 Potencial imunomodulador dos PNAs de banana	15
1.7 Receptores imunes para os polissacarídeos	17
1.8 Atividades biológicas dos BRMs	20
1.9 Relação função-estrutura dos polissacarídeos BRMs	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Bananas	25
3.2 Determinação de açúcares solúveis	25
3.3 Determinação de amido	26
3.4 Remoção de pigmentos, lipídeos, proteínas e compostos fenólicos livres e inativação enzimática	27
3.5 Extração da fração solúvel em água	27
3.6 Extração da fração insolúvel em água	28
3.7 Determinação do conteúdo monossacarídico da parede celular	29
3.8 Determinação de carboidratos totais através do método fenol-sulfúrico adaptado para microplaca	29
3.9 Fracionamento de PNA por cromatografia de exclusão por tamanho	30
3.10 Fracionamento por filtração de fluxo tangencial	31
3.11 Purificação em coluna de troca iônica	31
3.12 Hidrólise parcial de polissacarídeos por tratamento térmico	32
3.13 Método SEVAG para remoção de proteínas livres	33
3.14 Detecção de proteínas livres	33
3.15 Detecção de compostos fenólicos livres	34
3.16 Hidrólise enzimática dos polissacarídeos UFP e HTP	34
3.17 Macrófagos RAW 264.7	35

3.18	Células THP-1 e macrófagos diferenciados por PMA oriundos da THP-1 (TPM).....	36
3.19	Células HL-60	38
3.20	Análise de viabilidade celular e citotoxicidade por ensaio de redução de corante tertrazólio MTT.....	39
3.21	Deteção de endotoxinas	41
3.22	Avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 e macrófagos TPM	43
3.22.1	Citocinas	43
3.22.2	Óxido nítrico	44
3.22.3	Ensaio de inibição de produção de óxido nítrico	45
3.23	Avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados por PMA derivados de THP-1.	45
3.24	Avaliação dos marcadores de superfície celular expressos por células THP-1 após exposição ao LPS, GM-CSF e as frações polissacarídicas	47
4.	RESULTADOS.....	49
4.1	Caracterização das frações polissacarídicas	49
4.2	Análise da hidrólise enzimática dos polissacarídeos UFP e HTP	56
4.3	Ensaio de viabilidade e citotoxicidade das frações polissacarídicas.....	59
4.4	Determinação da atividade dos polissacarídeos sobre a produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7, macrófagos derivados por PMA oriundo de células THP-1 (TPM) e células THP-1 sem tratamento prévio ...	65
4.4.1	Macrófagos RAW 264.7	66
4.4.2	Macrófagos diferenciados por PMA oriundos de THP-1 (TPM).....	69
4.4.3	Células THP-1 sem tratamento prévio	81
4.5	Avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos RAW 264.7 e TPM estimulados pelas frações polissacarídicas.....	95
4.5.1	Macrófagos RAW 264.7	95
4.5.2	Macrófagos diferenciados por PMA oriundos de THP-1 (TPM).....	97
4.6	Marcadores de superfície celular expressos em células THP-1 após tratamento com as frações polissacarídicas	99
5.	DISCUSSÃO	104
6.	CONCLUSÃO	125
7.	BIBLIOGRAFIA.....	127
	ANEXO 1 – Ficha do Aluno.....	133

1. INTRODUÇÃO

A alimentação desempenha papel fundamental na manutenção do sistema imune, pois, além do aspecto nutricional, os alimentos podem conter substâncias que interagem direta ou indiretamente com o sistema imune, principalmente o de mucosas. Desse modo a pesquisa de substâncias com potencial imunomodulador ou modificadores de resposta biológica (*Biological Response Modifiers* - BRMs) presentes em alimentos tem ganhado força nas últimas décadas (IWASAWA; YAMAZAKI, 2009; LEUNG et al., 2006).

Ainda pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune pelos BRMs, mas já se comprovou que alguns podem atuar principalmente em receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs), que são proteínas imunes não clonais que reconhecem estruturas moleculares conservadas (*Patogen Associated Molecular Patterns* - PAMPs) partilhados por um enorme número de microrganismos. A ligação aos PRRs desencadeia eventos de sinalização mediados por proteínas Rel/NF- κ B levando à indução de genes que ativam a imunidade inata (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010). A interação dos BRMs com o sistema imune se dá, por exemplo, através de receptores *Toll-like* (TLRs), principalmente os TLR-2 e TLR-4, responsáveis pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS) da parede de bactérias Gram negativas e de patógenos em geral respectivamente (LULL; WICHES; SAVELKOUL, 2005; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Polissacarídeos não-amido (PNAs) extraídos de cogumelos comestíveis, como por exemplo, os beta-(1,3)-D-glicanos extraídos do *Lentinula edodes*, do *Schizophyllum commune* e do *Ganoderma lucidum* (BOH, 2013; SCHEPETKIN; QUINN, 2006), surgiram na década de 60 como agentes promissores no tratamento coadjuvante da quimioterapia em alguns casos de carcinoma, com a grande vantagem de apresentar baixa ou quase nenhuma toxicidade e com efeitos similares ou até melhores que do próprio quimioterápico *per se* (CHIHARA et al., 1970; INA et al., 2011; SHI; FU, 2011). Desde então, outros cogumelos, assim como algas e plantas fotossintéticas começaram a ser investigados como fontes de polissacarídeos com características de modular o sistema imune. Existem revisões na literatura mostrando os trabalhos já realizados com esses tipos de BRMs (LEUNG et al., 2006; LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SCHEPETKIN; QUINN, 2006), e é oportuno destacar que grande parte desses BRMs já estudados tem sua origem em fontes alimentares, sejam fúngicas, de algas (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; WANG et al., 2013), ou ainda de vegetais (HOLDERNESS et al., 2011; KARASAWA; UZUHASHI, 2011; PEREIRA DA SILVA; PAZ PARENTE, 2001).

Não obstante os trabalhos recaírem sobre os PNAs de fungos e cereais (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SCHEPETKIN et al., 2005), evidências como as de um estudo sobre os PNAs do açaí (HOLDERNESS et al., 2011) oferecem a perspectiva de uma nova frente de investigação, pois os frutos, além de serem fontes abundantes de polissacarídeos possuem a vantagem, comparativamente a outras fontes

de PNAs, de consumo *in natura*, ou seja, sem necessidade de processamento. Isso é importante, pois os polissacarídeos podem ter sua estrutura alterada substancialmente quando aquecidos em presença de ácidos, como ocorre na produção de geleias, por exemplo.

1.1 Polissacarídeos Modificadores de Respostas Biológicas

Os polissacarídeos com características de BRMs podem ser representados tanto por aqueles que constituem a reserva de energia no citoplasma, ou polissacarídeos estruturais presentes na membrana ou parede celular dos organismos (LEUNG et al., 2006). A seguir são apresentadas algumas informações a respeito de polissacarídeos BRM de origem vegetal, fúngica e de algas.

1.2 Polissacarídeos BRM de plantas fotossintetizantes

A parede celular vegetal é constituída por uma rede insolúvel composta por fibrilas de celulose, um polímero de β -(1,4)-D-glicose ligado, mantidas juntas pelas hemiceluloses, que são polissacarídeos ramificados com o esqueleto principal da molécula similar ao da celulose (unidades β -(1,4)-D-glicose ligadas), sendo na hemicelulose predominante o xiloglicano, além de outros como arabinoxilanos, glicomananos e galactomananos. O espaço interfibrilar na estrutura da parede é preenchido por materiais pectíneos ou simplesmente pectinas (MAXWELL et al., 2012).

Os polissacarídeos BRM derivados de plantas fotossintetizantes são caracterizados pela alta heterogeneidade da composição de monossacarídeos, abundância de ácido urônico e ramificações

complexas, que são características de materiais pectíneos presentes na parede celular primária da planta (JARVIS; FORSYTH; DUNCAN, 1988; VORAGEN et al., 2009). A pectina é funcional e estruturalmente o polissacarídeo mais complexo na parede celular das plantas, pertencente a uma família de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico incluindo homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos tipo I (RG-I) e tipo II (RG-II) e os xilogalacturonanos (XGA). A composição de celulose, hemicelulose e pectina pode variar de 30 a 25%, 30 a 55% e de 10 a 30%, respectivamente, dependendo da espécie, tipo celular e estado fisiológico da célula (HOCH, 2007). Os RG-I são as pectinas mais estudadas e tem a mais ampla ocorrência (LEUNG et al., 2006), tanto em angiospermas como em gimnospermas.

As moléculas de pectina estão interconectadas através do elemento boro, que permite formar uma rede macromolecular de pectina, e que podem conter pelo menos 12 diferentes unidades de monossacarídeos: D- GalA, D-GlcA, L-Rha, L-Gal, L-Ara, L-Fuc, O-metil-L-Fuc, D-Api, L-ácido acérico, entre outros e estão unidos por mais de 20 diferentes tipos de ligações glicosídicas, sendo que o esqueleto principal do RG-II contém pelo menos oito unidades de D-GalA (VORAGEN et al., 2009).

As pectinas estão abundantemente presentes em frutos como maçãs, ameixas, uvas, laranjas e oxicocos. Estruturalmente complexas, as pectinas consistem em regiões homogêneas (*smooth*) e ramificadas (*hairy*). As regiões homogêneas são lineares, contendo ácido poli-D-galacturônico metilado, enquanto as regiões ramificadas compreendem

resíduos alternados de L-ramnosil e D-galacturosil contendo pontos de ramificação de L-Ara e D-Gal, com até 20 resíduos de comprimento na cadeia. Como consequência, as pectinas adotam estruturas complexas quando em solução e há formação de ligações cruzadas através da ligação de hidrogênio do grupo ácido carboxílico (DUAN et al., 2008).

As pectinas e outros componentes da parede celular de plantas são bem conhecidos por possuir atividade imunomodulatória diversa que pode mediar tanto a fagocitose quanto a produção de anticorpos. A ampla diversidade estrutural dos polissacarídeos de parede reflete os diferentes mecanismos exercidos no sistema imune. Estes polissacarídeos podem ser utilizados para parar, prevenir ou curar diversas infecções ou patologias (WANG et al., 2014).

1.3 Polissacarídeos BRMs de origem fúngica

Os principais polissacarídeos BRMs derivados de fungos são os β -glicanos e os α -mananos. O β -glicano é obtido principalmente da parede celular de fungos que possuem quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, como componente da maioria das fibrilas presentes na parede celular insolúvel, sendo que a quantidade de quitina nas fibrilas pode ser tão alta quanto 80%. Os β -glicanos com ligações β -(1,3)-D- como esqueleto principal podem ser glicanos hidrossolúveis, glicanos solúveis em álcali (S-glicano) e glicanos insolúveis em álcali (R-glicano) (AKRAMIENE et al., 2007; LEUNG et al., 2006).

Alguns exemplos de cogumelos comestíveis que apresentam polissacarídeos dessa classe com efeitos imunomoduladores

comprovados são: o *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, e *Phellinus linteus* (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010).

Além dos fungos BRMs quitinosos, as leveduras são ricas fontes de β -glicanos e α -mananos. A construção da parede celular das leveduras é muito diferente das dos fungos quitinosos, sendo que os polissacarídeos que contribuem para a estrutura são a quitina, o manano, o β -(1,3)-D-glicano e o β -(1,6)-D-glicano. O estudo da parede celular do *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou que a composição varia de 1,4 a 7,9% de quitina, 28 a 67% de manano, 28 a 46% de β -(1,3)-D-glicano e de 5 a 11% de β -(1,6)-D-glicano (LESAGE; BUSSEY, 2006).

Os β -(1,3)-D-glicanos podem formar tanto uma estrutura simples helicoidal ou de tripla hélice compreendendo a rede de fibrilas assim como componentes amorfos, sendo que o grau de polimerização do glicano pode ser tão alto quanto 1500, o que corresponde a aproximadamente 240 kDa. O esqueleto principal de glicano pode ter ainda ramificações na posição 6 hidroxil (BROWN, 2006; MASIHI, 2000; WISMAR et al., 2010).

1.4 Polissacarídeos BRM das algas

Os polissacarídeos sulfatados das algas marrons são encontrados nas algas marinhas comestíveis sendo macromoléculas bioativas complexas e heterogêneas nas quais alguns grupamentos hidroxila nas unidades de açúcares são substituídos por grupamentos sulfato. Estes polissacarídeos aniônicos estão amplamente distribuídos na natureza e

ocorrem em uma grande variedade de organismos, porém as algas marinhas são as principais fontes (KIM et al., 2011).

Os fucanos sulfatados (fucoidanos) das algas marrons são reportados como polissacarídeos BRMs e são uns dos principais constituintes da parede celular, ao lado do ácido algínico e da celulose. Os polímeros de celulose formam uma trama de fibrilas insolúveis enquanto o ácido algínico, que é um polissacarídeo carregado negativamente com composições variadas de ácido glicurônico e manurônico, e os fucanos sulfatados ficam mergulhados na rede de fibrilas de celulose na forma de uma matriz amorfa.

O fucoidano é um polímero de unidades de L-fucose ligadas umas às outras por ligações α -D-(1,3)- com sulfatação principalmente na posição O-2,-4, ou -6. Variações estruturais incluem ligações α -D-(1,3)-, repetições alternadas de estruturas com ligações glicosídicas α -D-(1,3)-, α -D-(1,4)- e unidades de repetição de hexassacarídeos com alguma sulfatação em O-2, além da presença de xilose, galactose, manose, glicose, ramnose e ácido-D-glicurônico.

Recentemente, os ulvanos, polissacarídeos derivados da alga da família *Ulviceae*, tem atraído atenção, pois exibem características estruturais únicas contendo a ramnose e o ácido urônico como as principais unidades de repetição de dissacarídeo α -L-Rhap-(1,4)-D-Xylp e (1,4)- β -D-GlcpA-(1,4)- α -L-Rhap. Com relação aos efeitos biológicos, os ulvanos extraídos da *Ulva rigida* estimularam macrófagos a secretar óxido nítrico (NO) e prostaglandina-2 (PGE₂) pela indução do aumento de

mRNA de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxygenase-2 (COX-2) (KIM et al., 2011).

Além das algas marrons e das algas da família *Ulvaceae*, outros exemplos de algas comestíveis com efeitos imunomoduladores comprovados são *Laminaria digitata*, *Cladosiphon okamuranus* e *Undaria pinnatifida* (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010).

1.5 Principais polissacarídeos não-amido (PNAs) com potencial imunomodulador presentes em alimentos

1.5.1 Beta-glicanos

Os β -glicanos são homopolímeros de β -glicose formando moléculas lineares que podem, dependendo da estrutura, variar em solubilidade, massa molecular e viscosidade. A ligação glicosídica pode ocorrer exclusivamente nos carbonos 1 e 4 da D-glicose, formando polímeros insolúveis como no caso da celulose e também nos carbonos 3 ou 4. Neste caso, a cada quatro monômeros de D-glicose ligados por $\beta(1,4)$, ocorre uma ligação glicosídica $\beta(1,3)$, mudando a conformação da molécula linear, o que aumenta a sua solubilidade. Este tipo de β -glicano pode ser encontrado numa ampla variedade de plantas, como aveia, cevada, trigo e certas espécies de algas, além da parede celular de cogumelos como o *Ganoderma lucidum*, *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes*. Também são constituintes da parede celular de microrganismos patogênicos como *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (AKRAMIENE et al., 2007; LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Outra possibilidade de estrutura inclui β -glicanos insolúveis que possuem ligações glicosídicas $\beta(1,3)$ - e $\beta(1,6)$ -. Os $(1,3/1,6)$ - β -glicanos, principalmente os derivados de fungos e bactérias, também presentes em folhas, frutos e raízes de plantas superiores, produzem uma forte resposta imune no organismo, sendo utilizados como coadjuvantes nos tratamentos contra o câncer, alergias e como imunomoduladores (AKRAMIENE et al., 2007; CHAN; CHAN; SZE, 2009; LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005; MASIHI, 2000; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). As propriedades biológicas de preparações não-purificadas de β -(1,3)-glicanos têm sido estudadas desde a década de 1960. Estas moléculas mostraram possuir uma grande variedade de funções biológicas, incluindo atividade antitumoral e habilidade de prevenir uma ampla variedade de doenças infecciosas. Nesse sentido, sabe-se que os β -(1,3)-D-glicanos têm a habilidade de ativar, de forma não-específica, os componentes celulares e humorais do sistema imune. Essas moléculas aumentam a atividade antimicrobiana das células mononucleares e de neutrófilos, e aumentam a atividade dos macrófagos. Os β -(1,3)-D-glicanos insolúveis e solúveis estimulam a produção de mediadores pró-inflamatórios como componentes do sistema complemento, IL-1, TNF- α , IL-2, e eicosanóides (TZIANABOS, 2000).

Dentre os β -glicanos de origem fúngica, o zimosano, um composto misto extraído de *Saccaromyces cerevisiae*, é um dos β -(1,3)-glicanos mais investigados. Já foi comprovado que ele é um ativador das células imunes através de sua capacidade de aumentar a produção de

mediadores imunológicos, como o óxido nítrico, o $\text{TNF-}\alpha$ e a IL-10 (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; TZIANABOS, 2000).

De forma similar, os polissacarídeos exocelulares do fungo *Lentinula edodes*, como o lentinano (LNT), estão envolvidos no estímulo de macrófagos RAW 264.7, aumento da fagocitose e da síntese de óxido nítrico, assim como aumento nos níveis de RNA mensageiro de $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 e IL-23. O LNT já teve sua atividade imunomoduladora amplamente comprovada, sendo utilizado clinicamente em países orientais como adjuvante no tratamento quimioterápico, fortalecendo o sistema imune, além de ser utilizado como controle positivo em diversos estudos experimentais de imunomodulação com polissacarídeos de diversas origens (MIZUNO et al., 2001; SHI; FU, 2011).

Recentemente, um polissacarídeo extracelular denominado botriosferano, com peso molecular de um milhão de Daltons e com estrutura homóloga aos β -glicanos sulfatados, foi extraído do fungo *Botryosphaeria rhodina*. Sua atividade *in vitro* sobre macrófagos RAW 264.7 demonstrou forte ação imunomoduladora capaz de acelerar a linfoblastogênese, através do aumento de produção de óxido nítrico e do $\text{TNF-}\alpha$ (WENG et al., 2011).

No caso dos β -glicanos de plantas e algas, estes agem em diversos receptores imunes PRRs, como o dectina-1, o receptor de complemento (CR3) e o TLR-2/6 e ativam um grupo de células imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos, monócitos, células NKs e células dendríticas (CHAN; CHAN; SZE, 2009; LULL; WICHERS; SVELKOU, 2009).

2005; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; XIE et al., 2008). Para os β -glicanos da cevada, foi recentemente demonstrada ativação dose-dependente de macrófagos peritoneais com aumento de produção de IL-6 e IL-8 (WENG et al., 2011).

O destino destes compostos no organismo, seguido da administração via oral, depende amplamente de suas características físico-químicas que variam consideravelmente entre membros de um mesmo grupo, além de sua susceptibilidade à degradação durante o processo digestório, que de fato é muito limitada, pois a maioria destes compostos resiste à degradação e tem uma vida média longa dentro do organismo (OOI; LIU, 1999).

1.5.2 Arabinogalactanos

Os arabinogalactanos são polissacarídeos solúveis em água, altamente ramificados e com alto peso molecular (de 10 a 120 kDa), que contém unidades de D-galactose e L-arabinose (UDANI et al., 2010). Na natureza, os arabinogalactanos são encontrados em vários sistemas microbianos, especialmente na parede celular de micobactérias, e influenciam a imunoreatividade de monócitos e macrófagos contra o antígeno tubercular. Muitas plantas comestíveis e não-comestíveis são fontes ricas de arabinogalactanos, geralmente na forma de glicoproteínas, como a cenoura, rabanete, pera, milho, trigo, tomate, sorgo e artemísia (KELLY, 1999).

A análise da relação estrutura-atividade dos arabinogalactanos sugere que é necessário um esqueleto de β -D-(1,3)-galactano,

carregando longas cadeias laterais de β -D-Galp-1,6 ligado (mais que 3 graus de polimerização) na posição 6 do esqueleto de galactano para que ocorra a expressão da atividade imunomoduladora nas células imunocompetentes presentes nas placas de Peyer do intestino de ratos (SLAVOV; KIYOHARA; YAMADA, 2013).

Os arabinogalactanos que mostraram ter atividade imunomoduladora já foram extraídos dos frutos do açaí (*Euterpe oleracea*) (HOLDERNESS et al., 2011), das raízes do kiwi (*Actinidia eriantha*) (XU et al., 2009), dos frutos de babaçu (*Orbignya phalerata*) (PEREIRA et al., 2000), do morango estéril (*Potentilla anserina*) (CHEN et al., 2010), dos grãos integrais do trigo (CAO et al., 2011), além dos vegetais *Echinacea purpurea*, *Baptista tinctoria*, *Thuja occidentalis*, *Angelica acutiloba*, *Astragalus mongholics* e *Curcuma longa* e do cogumelo *Ganoderma lucidum* (LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; UDANI et al., 2010).

Em relação aos arabinogalactanos de origem vegetal, um dos representantes desta classe mais estudados quanto aos efeitos imunomoduladores foram os isolados das árvores do gênero *Larix*, que contém altas concentrações de arabinogalactanos. Esses polissacarídeos são do tipo β -(3,6)-D-galactanos, altamente ramificados, com cadeias laterais consistindo na combinação de monômeros de galactose, assim como cadeias mais longas contendo tanto resíduos de β -galactose e β -arabinose ligados nas posições 3,4,6-; 2,3,6-; 2,6-; 2,4- e 3-. Os arabinogalactanos extraídos do lariço-europeu (*Larix spp*) mostraram

estimular a citotoxicidade das células NK *in vitro*, através da geração de IFN- γ e inibir a metástase de células tumorais hepáticas em ratos, além de aumentar a microbiota intestinal, principalmente o número de bactérias anaeróbias como *Bifidobacterium sp* e *Lactobacillus sp* e diminuindo a presença do gênero *Clostridium sp*. (KELLY, 1999).

Em estudo feito por Kiyohara *et al* (KIYOHARA et al., 2010), uma fração polissacarídica extraída das partes aéreas do *Astragalus mongholicus* (AMOL-1) constituída em grande parte por arabinogalactanos, estimulou células imunocompetentes das placas de Peyer de ratos C3H/HeJ tanto *in vivo* quanto *in vitro*, com aumento expressivo na produção de IL-5 e IL-6. Para demonstrar que os efeitos eram provenientes desse polissacarídeo, a fração foi submetida à oxidação por periodato, e os produtos oxidados resultantes tiveram sua atividade imunomoduladora diminuída expressivamente. Um α -(1,6)-D-glicano isolado do grão de soja (*Glycine max*) com 480 kDa foi indiretamente capaz de induzir a diferenciação de células leucêmicas humanas U937 através da ativação da produção de citocinas pelas células mononucleares (LIAO et al., 2001).

1.5.3 Arabinoxilanos

Os arabinoxilanos são polissacarídeos compostos por 90% de monômeros de arabinose e xilose (CAO et al., 2011) encontrados em abundância principalmente em farelos de gramíneas (*Graminae*). Possuem uma estrutura polimérica de β -(1,4)-D-xilopirranose ligada a ramificações consistindo em resíduos de L-arabinofuranose, sendo essa

conformação a mais estável, podendo ocorrer substituições nas posições 2- e 3-, ou em ambas, e são geralmente constituídos por 1.500 a 5.000 monômeros.

O estudo de sua estrutura na forma de fibra mostra uma conformação de fita terciária. As moléculas livres em solução podem assumir uma ampla variedade de conformações com estruturas moderadamente estendidas. Apesar do esqueleto estrutural de xilano ser similar ao da celulose, existe pouca força para produzir formas cristalinas já que as pontes de hidrogênio intra e intermoleculares associadas ao grupamento 6-hidroxil estão ausentes. A presença de cadeias laterais de arabinose reduz a interação entre as cadeias devido à conformação de furanose, que é mais flexível e hidrofílica. No entanto, onde existem seções de dupla substituição de xilano a cadeia se torna relativamente inflexível e em forma de bastão (MASLEN et al., 2007).

Os arabinoxilanos extraídos dos cones de *Juniperus scopolorum* apresentaram potente efeito imunomodulador sobre macrófagos humanos e de ratos, indicado pela produção de óxido nítrico, aumento da produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, e TNF- α) tanto como anti-inflamatórias (IL-10), além de possuírem potente atividade fixadora de complemento (SCHEPETKIN et al., 2005).

Cao et al. (CAO et al., 2011) demonstraram que os arabinoxilanos extraídos do grão integral do trigo podem aumentar notavelmente a proliferação de esplenócitos, promover a reação de hipersensibilidade do

tipo tardia induzida por eritrócitos de ovelhas, e aumentar a atividade fagocítica em animais normais não-sensibilizados.

Os arabino-oligossacarídeos mostraram uma correlação entre o grau de polimerização (DP) e seu efeito sobre a produção de ROS. Quanto maior o DP dos arabino-oligossacarídeos, menor a produção de ROS pelas células imunes (Bland, Keshavarz & Bucke, 2004).

Outras classes de polissacarídeos, que não esses mencionados, também já tiveram seu efeito imunomodulador comprovado como já revisado amplamente por Ramberg et al. (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010), mostrando que qualquer classe de PNA possa possuir algum potencial sobre o sistema imune.

1.6 Potencial imunomodulador dos PNAs de banana

Os polissacarídeos não-amido constituem uma classe diversificada, extremamente abundante e que representa uma expressiva parcela da massa dos tecidos vegetais. Sendo assim, o seu potencial imunomodulador, demonstrado em diversos estudos, merece uma avaliação aprofundada, principalmente em relação aos polissacarídeos presentes em alimentos vegetais que são consumidos com frequência ou *in natura*, com poucas alterações.

Como mencionado anteriormente, existem estudos demonstrando as atividades imunomoduladoras de vários tipos de polissacarídeos, porém, normalmente focados em fungos, bactérias e no extrato de plantas superiores, sendo estas últimas principalmente de origem oriental. Poucos estudos foram feitos para testar os efeitos imunomoduladores dos

polissacarídeos de frutos, por exemplo, ainda que esses apresentem características estruturais ou de composição sugestivas de potencial imunomodulador.

A banana é uma monocotiledônea não-comelinóide com parede celular do tipo II, cuja composição monossacarídica sugere a presença de arabinoxilanos, ramnogalaturonanos, xiloglicanos, glicomananos, celulose e hemicelulose, sendo esta última fração descrita como um grupo heterogêneo de polissacarídeos como os β -glicanos, xilanos e mananos (CORDENUNSI; SHIGA; LAJOLO, 2008; SHIGA et al., 2011). Kato *et al* (KATO et al., 2001) observaram que xiloglicanos extraídos da parede celular de diversas frutas comerciais (kiwi, pêssego, abacate, maçã, figo, abacaxi e tangerina) e seus oligossacarídeos mostraram efeitos inibitórios no crescimento de células tumorais humanas COLO 201. Com os dados relativos aos PNAs da banana, e tendo o precedente dos estudos sobre o açaí, *Citrus spp*, *Avena spp*, entre outros vegetais, parece bastante provável que esses polissacarídeos tenham propriedades imunomoduladoras, já que a composição monossacarídica de suas frações é similar à encontrada em diversas outras plantas, fungos e algas que tiveram efeitos já comprovados (CORDENUNSI; SHIGA; LAJOLO, 2008; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; SHIGA et al., 2011).

Os PNAs da banana constituem um interessante objeto de estudo pelo fato de essa fruta ser um dos alimentos mais consumidos do mundo, estando disponível durante o ano todo e a preço acessível para a maioria da população. Além disso, tem a grande vantagem de apresentar maior

solubilidade em água e nenhuma toxicidade, o que não acontece com os polissacarídeos derivados de fungos, que além de poderem apresentar efeitos tóxicos, são pouco solúveis, dificultando a ingestão oral desses compostos ou o uso em concentrações mais altas (LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SILVEIRA, 2010). Nesse sentido, os PNAs com eventual ação imunomoduladora podem apresentar características interessantes também do ponto de vista tecnológico, o que poderá contribuir para que sejam também explorados insumos para a indústria alimentícia ou farmacêutica.

1.7 Receptores imunes para os polissacarídeos

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos. As respostas inatas imediatas são mediadas por uma variedade de tipos celulares, como neutrófilos e macrófagos, que irão fagocitar e matar patógenos invasores, através da secreção de mediadores inflamatórios e citocinas. A família de receptores *Toll like* (TLRs) apresentam papel central no reconhecimento de estruturas moleculares que são compartilhadas por vários patógenos, e até hoje foram identificados dez TLRs de mamíferos, sendo que algum deles, como no caso dos camundongos e ratos, foram identificados onze TLRs (KIM et al., 2012).

É sabido que polissacarídeos extraídos de *Panax ginseng*, *Echinacea purpurea*, *Glycine max*, *Juniperus scopolorum*, entre outros são capazes de se ligar a receptores presentes em macrófagos, como

receptores dectina-1, *Toll-like*, entre outros (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Os TLRs são expressos em células mielóides (monócitos, macrófagos e células dendríticas), células epiteliais, mastócitos e neutrófilos e somente o TLR-2 e o TLR-4 demonstraram reconhecer os polissacarídeos BRMs (BROWN, 2006). Os *Scavenger Receptors* (SRs) são expressos nos macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e células do músculo liso e o polissacarídeo que esses receptores reconhecem é o fucoidano (LEUNG et al., 2006). Por outro lado, o receptor de β -glicano é expresso amplamente por monócitos, macrófagos, DCs, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e B (AKRAMIENE et al., 2007), enquanto o receptor de manose é capaz de ligar polissacarídeos BRMs do tipo manano, sendo expresso nos macrófagos, DCs, células endoteliais hepáticas, células mesangiais dos rins, células do músculo liso traqueal e células epiteliais de pigmento da retina. Finalmente, o receptor de complemento do tipo 3 (CR3) é expresso principalmente nos macrófagos e neutrófilos, além de linfócitos T e B e células *Natural Killers* (NKs) que possuem a capacidade de reconhecerem polissacarídeos BRMs (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Os receptores *Toll-like* e SRs são dois grupos de diferentes PRRs e são capazes de reconhecer polissacarídeos BRMs. Os TLRs de mamíferos são homólogos a proteína *Toll* da *Drosophila sp*, a qual possui similaridade à família de receptores para interleucina-1 (IL-1) humana. O TLR é caracterizado por repetições ricas em leucina para recepção de ligantes e um domínio *receptor-like Toll/IL-1* para interação

com proteínas de sinalização intracelular (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Os SRs são receptores multi-domínio e multi-ligante expressos por macrófagos e por células dendríticas que reconhecem ligantes endógenos para manter a homeostase de tecidos e ligantes exógenos com o propósito de defesa pelo sistema imune. Em resumo, os PRRs do tipo SR que reconhecem polissacarídeos BRMs são: SR de classe A, receptor de β -glicanos, receptor de manose (MR) e CR3 (SULAHIAN et al., 2008).

O polissacarídeo ligante do receptor SR Classe A é geralmente o fucoidano, enquanto o receptor β -glicano/dectina-1 foi demonstrado ligar-se à β -(1,3)-D-glicanos. Por outro lado, os receptores de manose se ligam a unidades manosil ou fucosil ou a ligantes glicoconjugados com N-acetilglicosamina (GlcNAc) de uma maneira dependente de íons Ca^{2+} . O CR3 tem um papel importante tanto como molécula de adesão, quanto como receptor de membrana, reconhecendo ligantes como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), C3b fixado e β -glicanos (LEUNG et al., 2006).

No caso das proteínas plasmáticas, os polissacarídeos BRMs podem ser reconhecidos no plasma sanguíneo por lectinas ligadoras de manose (MBLs), pela via do complemento das lectinas, e por proteínas das vias clássica e alternativa do sistema complemento. A MBL é uma lectina multimérica que reconhece uma grande gama de patógenos, independente de um anticorpo específico. A ligação do MBL a uma macromolécula com manose, N-acetilglicosamina, fucose e resíduos de glicose, de densidades e orientações que se assemelham aos microrganismos, ativam a via de complemento das lectinas e então

desencadeiam uma resposta inflamatória. Os polissacarídeos BRMs que são reconhecidos pelos PRRs estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) e seus ligantes principais. Adaptado de (LEUNG et al., 2006).

PRRs	LIGANTE
TLR-2	Zimosano
TLR-4	β -(1,4)-D-glicano
<i>Scavenger Receptor</i> (SR)	Fucoidano, β -glicano
Receptor dectina-1/ β -glicano	β -(1,3)-D-glicano
CR3	β -(1,3)-D-glicano
<i>Mannose Receptor</i> (MR)	Manano
<i>Mannose Binding Lectin</i> (MBL)	Manano

Portanto, BRMs de diferentes fontes podem se ligar diretamente aos receptores presentes na superfície celular como TLR-2 ou dectina-1, reconhecidos por PRRs, ou ainda serem fagocitados e digeridos, ativando a cascata intracelular em macrófagos, através da produção de citocinas e quimiocinas (LEUNG et al., 2006).

1.8 Atividades biológicas dos BRMs

A resposta biológica que um polissacarídeo BRM pode desencadear é determinada pelo padrão de expressão de eventos celulares e moleculares resultantes da interação com seus receptores correspondentes ou proteínas ligadoras. Como mencionado anteriormente, os receptores e as proteínas ligadoras de polissacarídeos BRMs são derivados da imunidade inata e incluem TLRs, SRs, receptores de β -glicanos, CR3, MR, via alternativa e clássica do complemento, além da via de MBLs.

Células mielóides, que representam um papel fundamental tanto na imunidade inata quanto na adquirida, são os principais alvos dos polissacarídeos BRM. Os efeitos dos polissacarídeos BRMs sobre macrófagos são: fagocitose aumentada, produção de espécies reativas de oxigênio, expressão de marcadores de ativação como FcR e B-7, além da secreção de citocinas, como TNF- α e IL-6 (LEUNG et al., 2006).

Os polissacarídeos BRMs aumentam, portanto, a função efetora dos macrófagos, mais especificamente a capacidade de processamento do antígeno e de modular a imunidade adquirida através da secreção de citocinas, a apresentação de antígenos e a expressão de moléculas de adesão celular. A ativação direta de outras células imunes como NKs e linfócitos pelos polissacarídeos BRMs pode ser devido a um evento subsidiário ou secundário (HOLDERNESS et al., 2011; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Outras funções dos BRMs, além da ativação celular, envolvem a ativação das vias do complemento do sistema imune. A cascata do complemento ativada auxilia na remoção de patógenos diretamente ou indiretamente, através da ativação de macrófagos (LEUNG et al., 2006).

Os polissacarídeos BRMs geralmente são fortes mitógenos, ou seja, fazem com que monócitos, linfócitos T, linfócitos B e células NK cultivados *in vitro*, proliferem em resposta ao seu estímulo, o que é mediado pela ligação dos polissacarídeos aos seus receptores correspondentes. A ativação mitogênica dos monócitos *in vitro*, linfócitos B e células NKs pelos polissacarídeos BRMs é caracterizada pela utilização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) nos

eventos de sinalização intracelular. De acordo com HAN *et al.* (HAN *et al.*, 2003) e Yoon *et al.* (YOON *et al.*, 2012), isto pode ser um fenômeno comum a todas as células do sistema imune que possam ser estimuladas por um polissacarídeo BRM.

Os mecanismos imunomoduladores dos polissacarídeos BRMs não estão restritos somente a ativação mitogênica do sistema imune, mas também anti-apoptose. Hwang *et al.* (HWANG *et al.*, 2003) demonstraram que polissacarídeos purificados da *Artemisia iwayomogi* tiveram a capacidade de suprimir a apoptose de esplenócitos de camundongos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

1.9 Relação função-estrutura dos polissacarídeos BRMs

O estudo da relação função-estrutura dos polissacarídeos BRMs é dificultado pela complexidade da composição dos polissacarídeos, assim como as diversas ligações glicosídicas envolvidas. Quase todos os dados publicados estão restritos a polissacarídeos BRMs com composição e ligações de monossacarídeos simples, como β -glicanos ou α -mananos. A solubilidade de um β -glicano pode ser modificada por alterações químicas, sendo a polaridade aumentada pela sulfatação ou diminuída pela hidroxietilação e carboximetilação. De acordo com Leung *et al.* (LEUNG *et al.*, 2006), a diminuição na polaridade por hidroxietilação eliminou a atividade antitumoral de um β -(1,3)-D-glicano, observação similar feita por outros pesquisadores quando a carboximetilação foi introduzida para reduzir a polaridade previamente aumentada pela sulfatação.

O efeito da massa molecular nos polissacarídeos BRMs, a partir de estudos de β -glicanos ou α -mananos, é que a atividade do polissacarídeo aumenta com a massa molecular. A provável explicação para isso é que para ativar eventos imunes ou celulares, os polissacarídeos devem colidir com seus receptores ou proteínas de ligação em primeiro lugar. Provavelmente, polissacarídeos maiores tem uma maior chance de colidir de maneira eficiente e, além disso, polissacarídeos maiores têm mais unidades de repetição e, por isso, valência maior e, portanto, maior capacidade de se ligar a mais receptores e proteínas ligadoras.

Quanto ao efeito do grau de ramificação (DB – *Degree of Branching*) nas atividades dos β -glicanos, que pode ser modificado/diminuído através de reações enzimáticas ou degradação química, foi observado que para alguns β -glicanos a redução do DB leva a uma diminuição de sua atividade enquanto altos DB se correlacionam com alta atividade, apesar de alguns autores mostrarem que o DB tem uma correlação negativa com sua atividade, como revisado por Leung *et al* (2006).

Diferente do grau de ramificação, o número de dados que se referem ao efeito da conformação na atividade dos β -glicanos tem aumentado, mas as conclusões são conflitantes. Estudos demonstraram que tanto as conformações de hélice simples quanto de tripla hélice de um β -glicano, podem se ligar ao receptor de glicanos e foi sugerido que a conformação em tripla hélice é mais facilmente reconhecida por este receptor (LEUNG *et al.*, 2006; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010;

SCHEPETKIN; QUINN, 2006; WISMAR et al., 2010). Há evidências que a conformação em tripla hélice é mais ativa que a conformação em hélice simples, mas alguns autores demonstraram o contrário e alguns até sugerem que a potência relativa das conformações depende da forma de extração dos polissacarídeos, por exemplo (ALBERS et al., 2013).

No estudo feito por Guan (GUAN; LI, 2010), o tamanho molecular, o grau de polimerização, o grau de ramificação, a conformação da molécula e as ligações glicosídicas dos polímeros revelaram efeitos distintos, de acordo com o papel avaliado, que foi corroborado por estudo feito por Sheu & Lai (SHEU; LAI, 2012), demonstrando que polissacarídeos hidrossolúveis extraídos da *Boschniakia rossica*, com maior peso molecular e tendo uma conformação em tripla hélice, são capazes de promover a ativação de macrófagos de forma concentração dependente.

Em síntese, os parâmetros investigados que podem afetar a atividade dos polissacarídeos BRMs são: carga/solubilidade, peso molecular (MW), grau de ramificação e conformação da molécula (BAE et al., 2013; CHIRIGOS, 1992; FERREIRA et al., 2015; MAJI et al., 2013; SIMAS-TOSIN et al., 2012; TZIANABOS, 2000).

2. OBJETIVOS

Testar os polissacarídeos não amido hidrossolúveis isolados de bananas em cultivos celulares de células imunes granulocíticas de origem murina e humana e observar os efeitos de citotoxicidade, capacidade de estímulo de produção de citocinas, óxido nítrico, aumento na capacidade fagocitária e seu papel na diferenciação de monócitos THP-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bananas

As bananas (*Musa acuminata* L.) cv Nanicão (AAA), foram adquiridas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) após climatização comercial com etileno e acondicionadas no laboratório em câmara com temperatura controlada (18°C a 20°C). As bananas (*Musa acuminata* L.) cv Thap Maeo (AAB) foram adquiridas diretamente do produtor de Itapetininga (SP), e passaram pelas mesmas etapas de climatização descritas para cv Nanicão. Foram retiradas três amostras de frutas diariamente, perfazendo um total de 12 frutas, as quais foram descascadas, fracionadas, congeladas em N₂ líquido e reunidas de modo a constituir um *pool* representativo de seu estágio de amadurecimento. Essas amostras foram armazenadas a -80°C e posteriormente caracterizadas quanto aos teores de açúcares solúveis totais e amido. Foram utilizadas para o isolamento dos PNAs aquelas amostras representativas de frutas com características de amadurecimento plenamente desenvolvidas, indicadas pelo alto teor de açúcares solúveis livres e teor de amido inferior a 1% em peso fresco (SOARES, 2009).

3.2 Determinação de açúcares solúveis

Os açúcares solúveis foram analisados como descrito por Cordenunsi & Lajolo (2008), sendo extraídos da polpa integral com etanol 80% a 80°C por três vezes. Os sobrenadantes foram combinados em balão de 25 ml, e o volume completado com etanol 80%. O material foi

homogeneizado e uma alíquota de 1 ml separada em microtubo, e o etanol evaporado com sistema SpeedVac®. Os resíduos foram reconstituídos com 1 ml água deionizada, filtrados em membrana (0,45 µm) e analisados por HPAEC-PAD (Dionex DX 500, Sunnyvale, CA, EUA), utilizando uma coluna Carbopac PA1 (250 x 4 mm, 10 µm de tamanho de partícula). A fase móvel constituída de 18 mM NaOH e a velocidade de fluxo mantida constante (1,0 ml.min⁻¹). As injeções (25 µL) foram feitas usando injetor automático AS-50. Soluções de glicose, frutose, e sacarose a 1% (Sigma, Chemical CO, Saint Louis, MO, EUA) foram utilizadas como material de referência. As determinações foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em gramas por 100 g de amostra na base fresca (Cordenunsi & Lajolo, 2008).

3.3 Determinação de amido

Os teores de amido foram quantificados como descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995). Cerca de 0,2 g de amostra de polpa integral triturada foi homogeneizada com 0,5 M NaOH e, logo em seguida, neutralizada com 0,5 M de ácido acético e diluída a 10 ml. O amido foi precipitado da alíquota de 1 ml que foi retirada e lavada duas vezes com etanol (absoluto e 80%, nesta ordem) e os sobrenadantes foram desprezados. Todo o etanol foi evaporado e o resíduo seco foi incubado em banho-maria a 37°C com 1 ml de amiloglicosidase (28 U.ml⁻¹, Sigma A-7255), por 2 horas. Após esse tempo, foi adicionado 0,1 ml de 0,6M ácido perclórico para interromper a reação. Alíquotas de 0,1 ml dessa mistura foram incubadas com 1,5 ml de GOD/POD-ABTS por 15 minutos em banho-maria a 37°C e, posteriormente a absorbância foi determinada

a 450 nm. O amido de batata (Sigma, EUA) foi utilizado como material de referência. O total de amido foi calculado pela multiplicação da glicose livre pelo fator 0,9. A determinação foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em gramas por 100 g de amostra na base fresca.

3.4 Remoção de pigmentos, lipídeos, proteínas e compostos fenólicos livres e inativação enzimática

Para cada 5g de banana trituradas foram adicionados 250 ml de uma mistura metanol:clorofórmio (1:1 v/v) e mantida sob refluxo a 70°C por 1 hora. Nesse processo foram inativadas as enzimas que degradam a parede celular, além de remover outras substâncias. Após esse processo, o solvente foi retirado por filtração e o resíduo foi lavado por 3 vezes com acetona P.A. para desidratação da amostra. O solvente foi evaporado em estufa a 40°C por 16 horas e o resíduo restante, com aspecto de pó flocado branco, novamente triturado em gral para obtenção de um pó homogêneo.

3.5 Extração da fração solúvel em água

Para cada 0,5 g de pó cetônico, foram adicionados em tubo Corex® 10 ml de água deionizada, seguido de homogeneização e sonicação por 60 minutos. A amostra foi agitada e homogeneizada a cada 10 minutos com auxílio de uma espátula. A temperatura durante o processo de sonicação foi mantida entre 40°C $\pm$ 2°C. Após essa etapa a amostra foi centrifugada a 10000 rpm 4°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi ressuspendido em 10 ml de água deionizada e passado pelo processo de sonicação por mais uma

hora. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado e combinado com o anterior e adicionados quatro volumes de etanol absoluto 99%, de modo a alcançar a concentração final de etanol 80% para precipitação dos polissacarídeos. Essa suspensão foi deixada por 16 horas em geladeira 4°C e após a decantação a amostra foi filtrada em tecido com trama de 0,45 mm. O material insolúvel retido no tecido foi centrifugado nas mesmas condições acima para retirar o excesso de etanol e, depois, foram adicionados 7 ml de água deionizada estéril para diálise da amostra por 72h a 4°C utilizando membrana SpectraPor 3® (exclusão MW 3.500), realizando pelo menos 8 trocas da água deionizada nesse período. Após a diálise a amostra foi congelada a -80°C e submetida à liofilização. O resultado foi um material branco e cottonoso, considerado a fração de PNA solúvel em água (WSP).

3.6 Extração da fração insolúvel em água

Partindo do sedimento da etapa anterior, adicionaram-se a cada tubo 10 ml de DMSO a 90%, sendo submetido a banho de ultrassom por 90 minutos e homogeneização periódica. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi reservado e mais 10 ml de DMSO 90% foram adicionados ao precipitado e a mistura mantida por 16 horas sob agitação. Após esse período a suspensão foi centrifugada conforme explicado anteriormente e todo o procedimento foi repetido mais uma vez. Finalizada a última centrifugação, o sedimento foi solubilizado e submetido à diálise contra água deionizada por 72h a 4°C. Após congelado e liofilizado para análises posteriores, sendo considerado a fração de PNA insolúvel em água (WIP).

3.7 Determinação do conteúdo monossacarídico da parede celular

A composição monossacarídica da parede celular foi determinada após a hidrólise de polímeros não-celulose com ácido trifluoroacético (TFA). Cerca de 1 mg de WSP ou de WIP foram hidrolisadas com 1 ml de TFA 2M a 120°C por 60 minutos em um tubo cônico com tampa de rosca. Os hidrolisados foram centrifugados a 2000 x g por 5 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para um novo frasco e 1 ml de álcool butílico terciário foi adicionado. Essas misturas foram secas sob fluxo de N₂ e depois ressuspendidas em água. Posteriormente, 1ml de 2M H₂SO₄ foi adicionado ao resíduo da WIP restante e então as suspensões foram rehidrolisadas a 120°C por mais 90 minutos e, finalmente, neutralizados com uma solução de NaOH 50%. O conteúdo de açúcares dos hidrolisados de TFA e H₂SO₄ foram determinados por cromatografia líquida (HPAEC-PAD, Dionex DX 500, Sunnyvale, CA, EUA) segundo método descrito por Shiga et al (SHIGA et al., 2011).

3.8 Determinação de carboidratos totais através do método fenol-sulfúrico adaptado para microplaca

Para determinação de carboidratos totais foi utilizado o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) adaptado para microplaca por Masuko *et al* (2005). Resumidamente, 50 µL da amostra, do controle positivo (solução de glicose 1 mg.ml⁻¹), do controle negativo (água deionizada) e dos padrões (solução de glicose 1mg.ml⁻¹ em diluições seriadas até 0-0,156 mg.ml⁻¹) foram adicionadas aos poços da

microplaca, seguido de 150 μL de ácido sulfúrico puro e, por fim, 30 μL de uma solução aquosa de fenol a 5%. A placa foi então incubada em banho-maria a 90°C por 5 minutos e resfriada em banho de água imediatamente. Após 10 minutos para estabilização da reação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490nm. A média da absorbância de cada triplicata foi subtraída da média do branco e então calculada a concentração de carboidratos por ml de amostra a partir de uma curva de calibração.

3.9 Fracionamento de PNA por cromatografia de exclusão por tamanho

Foi realizada a cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna montada com resina Sephacryl S-400 (GE Healthcare, EUA). O tampão de eluição utilizado foi o tampão fosfato 0,1M acrescido de 0,15M cloreto de sódio e 0,02M azida sódica como conservante. Os padrões utilizados para a calibração da coluna foram dextranos de *Leuconostoc mesenteroides* grau HPLC (Sigma, EUA) nos tamanhos de 410, 150, 80, 50, 25 kDa e o azul de dextrano (Sigma, Suécia) (tamanho molecular aproximado de 2.000 kDa) para o cálculo do volume morto. Foi utilizado também um padrão de glicose a 1% dissolvido no tampão de corrida para o cálculo do volume interno da coluna.

As frações solúveis em água WSP das cultivares Nanicão e Thap Maeo liofilizadas foram pesadas e diluídas no tampão de corrida para uma concentração máxima de 1,5% (p/v) no volume a ser injetado (1 ml) na coluna. Para a cromatografia foi utilizado fluxo constante do eluente a 0,5

ml.min⁻¹ controlado por uma bomba P-1 (Pharmacia, Suécia) conectada ao sistema coletor de frações GradiFrac (Pharmacia Biotech, Suécia).

Foram inicialmente coletados 95 tubos a cada 4 min (2 ml.tubo⁻¹) para a calibração da coluna com os padrões e também das frações polissacarídicas não-amido das variedades Nanicão (N) e Thap Maeo (T). As amostras foram submetidas à separação em quadruplicatas com diferentes lotes de extração.

3.10 Fracionamento por filtração de fluxo tangencial

Para a filtração de fluxo tangencial foram utilizados cassetes de ultrafiltração Pellicon XL (área de filtragem 50 cm²) (Millipore, EUA) com limite de exclusão de 50 kDa. Esse sistema utiliza o sistema de ultrafiltração tangencial retroalimentado, o que permite filtragem de grandes volumes de material (até 50 ml.min⁻¹) e uma separação por tamanho molecular de acordo com a membrana utilizada. O sistema foi acoplado a bomba de pistão P-50 (Pharmacia, Suécia) e utilizado fluxo de 35 ml.min⁻¹. Cada amostra de parede celular solúvel foi submetida a esse processo, sendo retidas pelo filtro moléculas com peso maior que 50 kDa e presentes no filtrado aquelas com peso abaixo desse valor. Foi utilizada água deionizada como fase móvel, eliminando a necessidade de diálise das amostras.

3.11 Purificação em coluna de troca iônica

A fração polissacarídica maior que 50 kDa obtida por ultrafiltração tangencial foi submetida a separação por cromatografia de troca iônica em uma coluna HiTrap Q Sepharose FF (GE Healthcare Life Sciences,

Pittsburg, PA) de 1 ml. A coluna foi equilibrada com lavagens sucessivas de NaCl 2M, NaCl 1M e água destilada, por 10 minutos cada, sob fluxo de $0.825 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Foi injetada uma alíquota de 1 ml de uma solução de $15 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ dos polissacarídeos ultrafiltrados maiores que 50 kDa na coluna previamente equilibrada e posteriormente lavada com 10 volumes de água destilada. Os polissacarídeos ácidos ligados a resina foram liberados com lavagens sucessivas de 4.125 ml de solução de NaCl nas molaridades 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 e 1 M por 5 minutos cada, e o conteúdo de carboidratos totais foi monitorado utilizando o método Dubois fenol-sulfúrico adaptado para microplaca (Masuko et al., 2005). As frações eluídas com 0,5 e 1M NaCl dos UFP Nanicão e UFP Thap Maeo foram agrupadas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas para uso nos testes. Desse fracionamento obtivemos as frações: "UFP Nanicão" e "UFP Thap Maeo".

3.12 Hidrólise parcial de polissacarídeos por tratamento térmico

Parte das frações UFP de ambas cultivares foram submetidas a tratamento térmico para hidrólise parcial dos polissacarídeos e para eliminação de eventuais contaminantes. Para isso, 10 ml de cada amostra, a concentração de $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, foram submetidas a aquecimento a 121°C , por 15 minutos em autoclave (FABBE-PRIMAR modelo 103). Com esse tratamento foram obtidas as frações: "HTP Nanicão" e "HTP Thap Maeo".

Todas as frações obtidas foram filtradas em membrana com poro de 0,22 μm (Millipore, EUA) com intuito de eliminar qualquer tipo de contaminação microbiana.

3.13 Método SEVAG para remoção de proteínas livres

Apesar de ter sido utilizada a mistura clorofórmio:metanol nos passos iniciais da extração de parede celular, foi empregado o método Sevag (LIU et al., 2013) para remoção de eventuais proteínas livres das frações polissacarídicas isoladas. Dez miligramas de cada fração foram colocados em tubo Falcon de 50 ml e acrescentado um volume da mistura de butanol:clorofórmio (v:v 1:5) e agitado fortemente até completa dissolução. A amostra foi centrifugada a 310 x g por 10 min e o sobrenadante retirado. A interface água-clorofórmio, que contém as supostas proteínas desnaturadas, foi separada e seu conteúdo proteico foi dosado pelo método de Bradford.

3.14 Detecção de proteínas livres

Todas as frações polissacarídicas isoladas foram testadas para proteínas livres totais com o método de Bradford. Em tubos de ensaio foram aliquotados 1 ml do reagente de Bradford (Sigma, EUA) e adicionados 100 μl de uma solução de 1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cada fração polissacarídica isolada das cultivares Nanicão e Thap Maeo em água destilada. Para a construção da curva padrão, foram realizadas diluições seriadas de albumina sérica bovina nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50, 25 e 10 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ em água destilada. Após a incubação em temperatura ambiente por 10 min as amostras foram submetidas a leitura

em espectrofotômetro a 595 nm. Para o “branco”, foi utilizada água destilada.

3.15 Detecção de compostos fenólicos livres

Todas as frações polissacarídicas isoladas foram testadas para compostos fenólicos livres utilizando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu com o ácido gálico como referência. As frações isoladas foram diluídas em etanol 70% a uma concentração de 3 mg.ml⁻¹ e uma alíquota de 500 µl foi transferida para tubo Falcon de 15 ml e adicionado 2,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma, EUA) diluído 1:10 em água destilada. A reação foi mantida temperatura ambiente por 5 min e adicionados 2 ml de carbonato de cálcio a 4%. Os tubos foram mantidos em repouso em temperatura ambiente por 2 h, ao abrigo de luz e então realizada a leitura em absorbância de 740 nm. A amostra “branco” foi conduzida nas mesmas condições, não acrescentando as frações polissacarídicas ou o padrão de ácido gálico, cuja curva foi construída em concentrações de 100, 80, 60, 40, 20 e 10 mg.ml⁻¹ e os resultados expressos em equivalente de ácido gálico por grama de polissacarídeos isolados.

3.16 Hidrólise enzimática dos polissacarídeos UFP e HTP

Foram preparadas suspensões contendo 10 mg.ml⁻¹ das frações UFP ou HTP utilizando tampão acetato de sódio nos pH 5,5, 4,5 e 4,0, tampão glicina pH 8,8 e tampão fosfato de sódio pH 7,0, todos em concentração 100 mM. As suspensões foram incubadas separadamente utilizando, respectivamente, 5 µL (5U) de xiloglicanase isolada de

Paenibacillus sp. (E.C. 3.2.1.151; Megazyme International Ireland; Wicklow, Ireland); 3 μ L (5U) de β -xilanase isolada de *Trichoderma viride* (E.C. 3.2.1.8; E-XYTR1; Megazyme); 3 μ L (5U) de endopoligalacturonase isolada de *Aspergillus niger* (E-PGALS; E. C. 3.2.1.15; Megazyme); 10 μ L (3.9 U) de endo-(1,4)- β -mananase isolada de *Bacillus* sp. (E.C. 3.2.1.78; E-BMABS; Megazyme); 5 μ L (5 U) de endo-/exo-arabinanase isolada de *Cellvibrio japonicus* (E.C. 3.2.1.99; E-ARBACJ; Megazyme).

Todas as soluções foram incubadas a 40 °C por 2 h e passadas através de filtro com poro de 40 μ m. Os hidrolisados foram analisados utilizando uma coluna de troca aniônica analítica PA1 (Dionex, 250 x 4mm) com sua respectiva coluna de guarda em um HPAEC-PAD System DX500 (Dionex) equipado com uma bomba de gradiente GP4 (Dionex), um detector ED 40 com eletrodo operante de ouro e um eletrodo de referência de Ag/Cl e um auto amostrados AS50 (Dionex) para detecção dos oligômeros dos polissacarídeos. NaOH 65 mM foi utilizado como eluente, com gradiente de 500 mM NaOAc de 0 a 175 mM iniciando aos 4 min e terminando aos 40 min. A temperatura da coluna foi fixada em 30°C. Um passo de lavagem de 10 minutos entre as amostras foi incluído utilizando NaOH 200 mM contendo 200 mM de NaOAc. O “branco” utilizado consistiu nas soluções sem adições das respectivas enzimas.

3.17 Macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos RAW 264.7 utilizados nesse estudo foram gentilmente cedidos pelo laboratório de lípidos (Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da USP), recebidos livre de micoplasma e outros contaminantes e mantido sob repique a cada três dias.

Para o cultivo dos macrófagos foi utilizado o meio DMEM (contendo 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas). Após a confluência celular, observada através de microscopia invertida, procedeu-se à raspagem das células com auxílio de um raspador, acrescentando 1 ml do meio completo e retirado 10 μ L para realizar a coloração com azul de Trypan (Sigma, EUA) (1:1 v/v), a fim de verificar a porcentagem de células vivas e procedendo com contagem em contador automatizado e ajustada para diluição inicial de 10^4 células.ml⁻¹, e realizada nova passagem para outra garrafa de cultivo contendo no total 8 ml de meio completo e cultivados a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Os macrófagos cultivados foram divididos em alíquotas em frascos estéreis à uma concentração de 10^7 células.ml⁻¹ de meio completo suplementado com 10% de DMSO estéril (Sigma, EUA) e congelados em nitrogênio líquido para o estoque de células. Os macrófagos em uso foram mantidos sob repique constante, a cada 3 dias, sendo avaliados diariamente quanto a morfologia e qualquer alteração citopática.

3.18 Células THP-1 e macrófagos diferenciados por PMA oriundos da THP-1 (TPM)

A linhagem tumoral mielomonocítica humana THP-1 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), certificada para ausência de micoplasma e outros contaminantes. O cariótipo também foi avaliado

mostrando homologia das THP-1 oriundas da American Type Culture Collection (ATCC).

As células THP-1 foram cultivadas em suspensão no meio RPMI 1640 (contendo 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Campinas). Após atingirem uma população de aproximadamente 1.10^6 células.ml⁻¹, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml do meio completo. Dez microlitros dessa suspensão foram retirados para realizar a coloração com Azul de Trypan (1:1 v/v), a fim de verificar a porcentagem de células vivas e proceder à contagem em contador de células automático TC-20 (BioRad, EUA) e ajuste para diluição inicial de 2.10^4 células.ml⁻¹, sendo realizada nova passagem para nova garrafa de cultivo contendo no total 4 ml de meio completo e cultivados em estufa 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Após atingirem uma população de aproximadamente 1.10^6 células.ml⁻¹, contadas em contador automatizado e coradas por azul de Trypan (v 1:1), as células foram centrifugadas e semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 2.10^5 células.ml⁻¹ ou de 2.10^6 células.ml⁻¹ de acordo com o ensaio utilizado, e adicionadas uma solução 5mM de PMA (Phorbol 12-miristato 13-acetato – Sigma, Israel) dissolvida em DMSO estéril (0,01% - Sigma, EUA) e incubadas por 48 horas para permitir a diferenciação dos monócitos em macrófagos. Após o período de diferenciação, as placas foram lavadas por três vezes em PBS estéril para retirada do PMA, células mortas ou não-diferenciadas e incubadas em meio RPMI 1640 completo por mais 5 dias para que os genes expressos

durante a diferenciação voltem ao estado de repouso metabólico, resultando nos macrófagos diferenciados por PMA oriundos da linhagem THP-1 (TPM)(PARK et al., 2007). No quinto dia, as populações celulares foram avaliadas por microscopia óptica em busca de mudanças morfológicas como aumento do citoplasma e espreadimento celular. As células THP-1 em uso foram mantidas sob repique constante, a cada 3 dias, sendo avaliadas diariamente quanto a morfologia e qualquer alteração citopática.

As células THP-1 não-diferenciadas foram aliquotadas em frascos estéreis a concentração de 10^7 células.ml⁻¹ de meio completo suplementado com 10% de DMSO estéril (Sigma, EUA) e congelados em nitrogênio líquido na fase gasosa para o banco de células.

3.19 Células HL-60

A linhagem tumoral mielocítica humana HL-60 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), recebida em passagem desconhecida e certificada para ausência de micoplasma e outros contaminantes. O cariótipo também foi avaliado mostrando homologia das THP-1 oriundas da American Type Culture Collection (ATCC).

As células HL-60 foram mantidas em meio DMEM modificado por Iscove (IMEM - Cultilab, Campinas) que consiste no meio DMEM suplementado com alta concentração de glicose (4.5 g.ml⁻¹) e glutamina (300 mM), adicionado de 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas com concentração inicial de 4.10^4 células.ml⁻¹ sendo que mesmas foram ressemeadas a cada vez que a população atingisse 8.10^5

células.ml⁻¹. Para isso, as amostras foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos, realizada a contagem com contador automático e coradas pelo azul de Trypan, como descrito anteriormente.

As células HL-60 foram aliqotadas em frascos estéreis a concentração de 10⁷ células.ml⁻¹ de meio completo suplementado com 10% de DMSO estéril (Sigma, EUA) e congeladas em nitrogênio líquido na fase gasosa para o banco de células.

3.20 Análise de viabilidade celular e citotoxicidade por ensaio de redução de corante tertrazólio MTT

O ensaio de viabilidade celular e citotoxicidade foi baseado na medida do dano induzido pelo material de estudo no metabolismo celular de glicídios indicado pela atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, foi quantificada pela redução enzimática do corante MTT tertrazólio (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), um sal de coloração amarela e hidrossolúvel, a formazano, um sal de coloração arroxeadada, insolúvel em água pela atividade das desidrogenases. Dessa forma, a redução do MTT a formazano foi diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

Como meio de cultura foi utilizado meio DMEM (Cultilab, Campinas) para os macrófagos RAW 264.7, o meio RMPI 1640 (Cultilab, Campinas) para macrófagos TPM e o meio IMEM (Cultilab, Campinas) para as células HL-60. Todas as culturas foram suplementadas com soro fetal bovino (SFB) a 10% e solução de antibióticos a 1% (penicilina 10.000

UI.ml⁻¹ e estreptomicina 10.000 µg.ml⁻¹). Os meios adicionados de soro e antibióticos foi considerado neste trabalho como meio completo (CM) e como suporte foi utilizada placa de 96 poços de fundo chato.

A solução de estoque de MTT (Sigam, EUA) a 5 mg.ml⁻¹ foi preparada solubilizando o sal em tampão PBS estéril, sendo a solução de uso diluída 1:10 em meio completo.

A suspensão celular de macrófagos RAW 264.7 ou de macrófagos tratados por PMA derivados de THP-1 foi preparada com 5.10⁴ células.ml⁻¹ em meio completo. O procedimento do teste consistiu em adicionar um volume de 200 µL da suspensão por poço de microplaca de 96 poços e incubada em estufa de atmosfera CO₂ 5% a 37°C (± 1°C) por 24 horas, sendo que após esse período todo o meio de cultura foi removido de forma estéril por meio de uma bomba de vácuo, restando apenas os macrófagos aderidos, os quais foram reservados para a etapa seguinte, em que foi adicionada em cada poço da microplaca 100 µL de LPS (2 µg.ml⁻¹, controle positivo) ou somente meio completo (controle negativo) ou dos polissacarídeos em teste nas concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹, diluídas em meio completo e incubada em estufa de CO₂ 5% pelo período de 24 e 72 horas. No fim dos respectivos tempos, as placas foram centrifugadas a 200 x g por 2 minutos e os poços foram lavados por duas vezes com PBS estéril a 37°C e então adicionados 100 µL da solução de uso de MTT.

A placa foi mantida na estufa por 2 horas e após esse período a solução de MTT foi removida dos poços após a centrifugação como

descrito acima e na sequência foram adicionados 100 µL de DMSO puro para dissolução dos cristais de formazano. A placa foi agitada por 5 minutos a 100 rpm e deixada em repouso por mais 5 minutos para a estabilização da reação. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

Todos os testes foram realizados em triplicatas, incluindo os brancos, controles positivos e negativos, além das frações polissacarídicas testadas. Foram calculadas as médias de todas as leituras de absorbância e subtraídas da média das leituras das absorbâncias dos brancos. Para o controle negativo foi considerado 100% das células viáveis.

As médias de valores de absorbância dos testes, divididos pelas médias de absorbâncias do controle negativo multiplicado por 100 resultou na viabilidade celular em porcentagem, sendo que as substâncias não são consideradas tóxicas caso a viabilidade seja igual ou superior a 90% de células cultivadas.

3.21 Detecção de endotoxinas

Para testar a presença de endotoxinas foi feito o ensaio para detecção de LPS em amostras biológicas com lisado de amebócito de caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*) que se baseia na resposta coagulativa do sangue do caranguejo em contato com a endotoxina. O método utilizado para detecção de endotoxinas nas amostras estudadas foi o LAL KIT QCL-1000™ LONZA (LONZA, EUA). Para alguns ensaios

as amostras foram tratadas com o inibidor β -G-Blocker (1:1 v/v) (LONZA, EUA).

As amostras foram analisadas em triplicata, incluindo os controles positivos e negativos. A curva de calibração foi realizada também em triplicata utilizando endotoxina com potência 36, fornecida pelo fabricante, e a partir dessa solução foram diluídos padrões contendo 1, 0,5, 0,25 e 0,1 EU.ml⁻¹. A reação foi realizada conforme instruções do fabricante e, resumidamente, a placa foi pré-equilibrada a 37°C e 50 μ L das amostras ou padrões foram dispensadas nos poços adequados. Todos os testes correram em triplicatas, incluindo os brancos (água livre de endotoxina) e os padrões. Uma vez pipetadas todas as amostras, foram retiradas da incubadora e agitadas repetidamente, devolvidas para incubadora e mantidas a 37°C por mais 10 minutos. Após esse período foram adicionados 100 μ L da solução de substrato em cada poço, mantendo-se uma taxa constante de pipetagem. Uma vez adicionada a solução, a placa foi retirada da incubadora e agitada para facilitar a mistura sendo devolvida a incubadora. Após 16 minutos, foram adicionados 100 μ L do reagente de parada da reação e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm.

As médias das absorbâncias observadas, subtraídas das médias das absorbâncias dos brancos foram aplicadas na curva de calibração. Foram consideradas isentas de endotoxinas as amostras com índices de endotoxinas detectáveis próximos ao limite inferior do kit (0,1 EU.ml⁻¹).

3.22 Avaliação da produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 e macrófagos TPM

3.22.1 Citocinas

Para este ensaio foram utilizadas placas de 24 poços e cultivados em cada poço $2 \cdot 10^6$ macrófagos. ml^{-1} de meio completo. O meio completo sem nenhuma adição foi utilizado como controle negativo e o meio completo adicionado de $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de LPS foi utilizado como controle positivo. As frações polissacarídicas solúveis WSP, UFP e HTP das cultivares Nanicão e Thap Maeo, nas concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ em meio completo foram utilizados para os testes, com exceção das concentrações consideradas tóxicas.

Após adição dos cultivos nas placas estas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera 5% CO_2 por 24 horas. Após este período, o sobrenadante de cada cultivo foi aspirado cuidadosamente e o material foi mantido congelado a -80°C até as análises serem realizadas.

A análise de citocinas para os macrófagos murinos RAW 264.7 foi realizada utilizando o kit de citocinas Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (CBA – BD Biosciences, EUA) para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ e CBA flex set para IL-1 β e IL-12p70. Já o kit Human Inflammatory Cytokine Cytometric Bead Array (CBA – BD Biosciences, EUA) foi utilizado para dosar as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e $\text{TNF-}\alpha$ nas células humanas THP-1 e os macrófagos TPM dessa mesma linhagem, seguindo as orientações do fabricante.

Para a análise de citocinas, foram adicionados 10 μ L de cada pérola (*bead*) de captura (correspondente a citocina de interesse a ser analisada/tubo de amostra) em um tubo plástico de 15 ml que foi identificado como “Mix de beads de captura”. Dessa forma, se foram analisados 20 tubos para IL-2, por exemplo, então foram pipetados 200 μ L de pérolas de captura para IL-2 e da mesma forma para as outras citocinas analisadas. Em tubos plásticos 12x75 mm, foram adicionadas 25 μ L da mistura de pérolas de captura, 25 μ L do sobrenadante dos cultivos celulares e 25 μ L do reagente de detecção. Os tubos foram incubados por 2 horas (3 horas para o kit humano) a temperatura ambiente, no escuro. Após incubação, cada tubo foi adicionado de 0,5 ml de tampão de lavagem e centrifugado a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida foram adicionados 150 μ L de tampão de lavagem em cada tubo, para posterior aquisição no citômetro de fluxo FACSVERSE (BD Biosciences, EUA) utilizando o programa BD FACSuite (BD Biosciences, EUA). Os dados foram analisados utilizando o programa FCAP Array (BD Biosciences, EUA).

3.22.2 Óxido nítrico

Para análise do óxido nítrico, foram feitas análises no mesmo sobrenadante utilizado para as citocinas oriundo das células tratadas com as frações de polissacarídeo. A produção de NO foi medida indiretamente (nitritos solúveis) através da adição de 100 μ L do sobrenadante do cultivo tratado com as frações polissacarídicas e 100 μ L reagente de Griess. Após agitação por 5 minutos, as absorbâncias foram lidas a 540 nm e a

curva de calibração preparada com concentrações decrescentes de nitrato de sódio (Sigma, EUA).

3.22.3 Ensaio de inibição de produção de óxido nítrico

Este ensaio foi conduzido somente para os macrófagos humanos derivados de THP-1 diferenciados em 48h pelo PMA 5 ng.ml⁻¹ (TPM) e para as células THP-1. Os macrófagos TPM e células THP-1 foram cultivados em placas de 24 poços a uma concentração de 2.10⁶ células.ml⁻¹ por 24h nas mesmas condições descritas no item 2.20.2, com adição de 250 nM de acetato de N^G-Metil-L-Arginina (L-NMA – Sigma, Israel) dissolvido no próprio meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB, aos poços de tratamento com as frações polissacarídicas e com os controles. O controle negativo consistia nas células incubadas somente com CM, e o controle positivo nas células estimuladas com 2 µg.ml⁻¹ de LPS. O L-NMA é conhecido por inibir parte da cascata de produção de óxido nítrico, já que a arginina presente neste composto não funciona como substrato para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A produção de NO foi determinada indiretamente através do reagente de Griess, a curva padrão foi realizada da mesma maneira descrita no item 2.20.3 e as leituras realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm.

3.23 Avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos RAW 264.7 e macrófagos diferenciados por PMA derivados de THP-1.

Para este ensaio foram utilizadas placas de 24 poços e cultivados em cada poço 2.10⁵ macrófagos.ml⁻¹ em meio completo em triplicatas utilizando uma lamínula redonda estéril (13 mm) como suporte de

crescimento das células. O meio completo sem nenhuma adição foi utilizado como controle negativo e o meio completo adicionado de $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de LPS foi utilizado como controle positivo. As frações polissacarídicas solúveis obtidas das cultivares Nanicão e Thap Maeo, nas concentrações de 10, 50 e $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ em meio completo, foram utilizadas para os testes, com exceção das concentrações consideradas tóxicas.

Após adição dos cultivos nas placas estas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera 5% CO_2 por 24 horas e posteriormente, o sobrenadante de cada cultivo foi aspirado cuidadosamente e adicionado 1 ml de uma solução contendo 2.10^6 partículas. ml^{-1} de zimosano (Sigma, Israel) dissolvido em meio completo. A placa foi incubada a 37°C por mais 2 horas para que ocorresse a fagocitose e, utilizando microscopia ótica com objetiva de 1000 vezes de aumento, foram contados os números totais de macrófagos, os números de macrófagos que fagocitaram partículas de zimosano e os números de partículas fagocitadas em 100 campos e em triplicata. Os resultados foram expressos pelo índice de fagocitose (PI), onde $\text{PI} = ([\text{número de partículas fagocitadas teste}] / [\text{número de partículas fagocitadas no teste do Zymosan}]) / 100$, assumindo o valor do teste negativo “PI=0” e o valor do teste positivo (Zymosan) “PI=100”.

3.24 Avaliação dos marcadores de superfície celular expressos por células THP-1 após exposição ao LPS, GM-CSF e as frações polissacarídicas

As células THP-1 foram cultivadas em placas de 24 poços em triplicatas a uma concentração de $2 \cdot 10^5$ células.ml⁻¹ durante 24h em estufa com atmosfera de CO₂ a 5% umidificada e temperatura de 35°C ($\pm$ 1°C) juntamente com as frações polissacarídicas WSP, UFP e HTP de ambas as cultivares Nanicão e Thap Maeo na concentração final de 200 µg.ml⁻¹, com 2 µg.ml⁻¹ de LPS como indutor de TLR-4 e 800 U.ml⁻¹ GM-CSF (Sigma, USA) servindo como controle positivo de ativação de todos os marcadores. As células com meio completo serviram como controle de referência para os marcadores de superfície pesquisados nas células THP-1 sem tratamento. Após o período de incubação as células foram coletadas, contadas e a viabilidade verificada através do ensaio com o azul de Trypan, havendo mais de 95% de células viáveis em todos os ensaios.

Para a marcação imunológica, as células foram centrifugadas e lavadas em PBS estéril por três vezes a fim de eliminar qualquer resquício de meio e dos tratamentos aplicados e ressuspensas em seu volume original. Então, 100 µl da suspensão celular de cada amostra de cultivo foram distribuídas em tubos de poliestireno 12x75 mm e em seguida foram acrescentados os anticorpos monoclonais, os quais foram previamente titulados seguindo orientações do fabricante: TLR-2 BB515 (clone 11G7), TLR-4 PE (clone TF901), CD33 PerCP-Cy 5.5 (clone P67-6), CD123 APC (clone 9F5), CD11c PE-Cy^{TM}7 (clone B-ly6), CD14 APC-

H7 (clone M ϕ P9), todos provenientes da Becton, Dickinson and Company (San Jose, CA, EUA). A incubação foi realizada por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro e, em seguida, os tubos foram lavados com 1 ml de solução de PBS acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB) e centrifugados por 5 min a 200 x g. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 300 μ l de PBS com 2% SFB, para subsequente aquisição no citômetro de fluxo FACSVerse (Becton & Dickinson, CA, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos dentro do *gate* de células com médio tamanho (FSC) e baixa complexidade (SSC), as quais correspondiam às células de interesse. Para definir a estratégia de *gate* utilizada, ou seja, em que posição o marcador deveria ser posicionado para que uma população fosse considerada positiva, foram realizados tubos controles FMO (*Fluorescence Minus One*). Esses tubos controle continham todas as fluorescências utilizadas no estudo (mencionadas acima) menos uma delas. Dessa forma, foi possível determinar a posição do marcador (*gate*) sem que houvesse interferência das outras fluorescências, dando confiabilidade ao resultado. Tendo os *gates* foram posicionados corretamente, foi possível determinar a porcentagem de positividade e a intensidade média de fluorescência (MFI) de cada parâmetro analisado.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das frações polissacarídicas

Foram preparadas nove replicatas de extração de polissacarídeos da cultivar Nanicão e sete da cultivar Thap Maeo. Os rendimentos médios das WSP e WIP para cada cultivar estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 2. Rendimento médio de extração de WSP e WIP a partir da polpa de banana das cultivares Nanicão e Thap Maeo congelada em nitrogênio líquido.

Cultivar	Rendimento (mg.g ⁻¹ banana)	
	WSP	WIP
Nanicão (n=9)	6,4 (±0,48)	18,46 (±1,15)
Thap Maeo (n=7)	3,76 (±0,5)	25,01 (±1,35)

Foi observado que a cv Nanicão possui maior quantidade de material solúvel (34,7%) do que a cultivar Thap Maeo (13%), enquanto o inverso ocorre com a fração insolúvel em água (65,3% e 87%, respectivamente). Esses dados corroboram estudos anteriores realizados com as cultivares Nanicão e Mysore, esta última pertencente ao grupo genômico AAB, assim como a cv. Thap Maeo (SHIGA et al., 2011).

Neste estudo foi avaliado o potencial dos polissacarídeos presentes na parede celular da banana para o consumo *in natura*, ou seja, somente as frações solúveis em água de ambas as cultivares foram utilizadas nos testes imunológicos. A análise do conteúdo monossacarídico das frações WSP, UFP e HTP de ambas as cultivares

nos revelou os seguintes teores em porcentagem molar representados na Figura 1.

Figura 1. Porcentagem molar de unidades de monossacarídeo encontrados em (A) polissacarídeo solúvel em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados e (C) polissacarídeos com tratamento térmico das bananas Nanicão e Thap Maeo. Açúcares neutros e ácidos foram determinados: arabinose (ARA), fucose (FUC), galactose (GAL), ácido galacturônico (GAL UA), glicose (GLC), manose (MAN), ramnose (RHA) e xilose (XYL). Os dados estão representados pela média $\pm$ erro padrão ($n=9$). O teste t de Student foi utilizado para determinar a significância estatística das diferenças entre os valores para as cultivares Nanicão e Thap Maeo. p-valor * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.005 , *** ≤ 0.0005 , **** ≤ 0.0001 . NS: não significante.

Analisando os monossacarídeos constituintes da WSP é possível constatar que em ambas cultivares há predomínio de ácidos galacturônicos, seguido de xilose, glicose, galactose e ramnose e em menor quantidade outros monossacarídeos como manose, ácido glicurônico, arabinose e fucose. Nas frações UFP e HTP não houve mudança significativa nas concentrações molares, com exceção do ácido glicurônico cultivar Nanicão, que estava ausente nestas frações e presente nas frações WSP.

Nas frações WSP, houve diferença estatisticamente significativa entre as cultivares quanto a composição molar dos monossacarídeos ácido glicurônico, ramnose, galactose, glicose, xilose e ácido galacturônico, enquanto que não apresentaram diferenças entre as cultivares os monossacarídeos fucose, arabinose e manose. Já nas frações UFP, houve diferença entre as composições de manose e não houve diferença na composição de galactose, o que demonstra que a diferença entre o tamanho molecular das duas amostras acarreta na diminuição molar de manose principalmente. Também é possível notar que após a ultra filtração houve perda significativa de xilose na fração UFP da cultivar Thap Maeo quando comparada com a fração WSP, portanto, os polissacarídeos de baixo peso molecular provavelmente pertencem à classe de xiloglicanos e xilogalacturonanos.

Nas frações que passaram por tratamento térmico HTP, apenas pode ser observado o aparecimento de ácido glicurônico na cultivar Nanicão indicando a provável quebra de moléculas de glicuronoarabinoxilanos, já o oposto foi observado na cultivar Thap Maeo,

onde este monossacarídeo aparece na fração UFP e depois não é detectado nas amostra HTP, possivelmente perdidos após a diálise de fragmentos de baixa massa molecular das pectinas e/ou hemiceluloses clivadas durante o tratamento térmico.

Com base na distribuição molar podemos supor que essas frações sejam compostas principalmente por polissacarídeos do tipo homogalacturonanos, mananos, arabinogalactanos, galactomananos, xilanos, xiloglicanos, xilogalactorunanos, ramnogalacturonanos entre outros, todos esses de interesse, pois podem agir modulando o sistema imune. Já as WIP de ambas as cultivares apresentaram quantidades expressivamente superiores de ácido galacturônico, além da presença de glicose, arabinose, xilose, galactose e manose, sugerindo a ocorrência de polissacarídeos do tipo calose, arabinogalactanos e arabinoxilanos, porém, estas amostras não foram utilizadas nos ensaios de imunomodulação, pois neste trabalho foi avaliado somente compostos hidrossolúveis.

Para a separação de frações polissacarídicas através de cromatografia de exclusão por tamanho, a mesma metodologia foi utilizada para as WSP de ambas as cultivares, sendo realizadas seis replicatas de cada. Os cromatogramas das WSP das cultivares Nanicão e Thap Maeo estão representados na Figura 2.

Figura 2. Cromatograma da WSP obtida da cv Nanicão (A) e Thap Maeo (B) em coluna Sephacryl S-400. Foram aplicadas quantidades de amostra de 0,5 a 1,5 mg, de acordo com a viscosidade do material, em volume de injeção de 1ml. Como eluente foi utilizado tampão fosfato 0,05M, NaCl 0,15M e azida sódica 0,02M a um fluxo de 0,5 ml.min⁻¹.

Como pode ser notado, houve diferenças nos perfis dos polissacarídeos de cada cultivar, porém, consistentes entre as replicatas, com tamanhos moleculares entre 17 e 1210 kDa para a cultivar Nanicão e 13 e 1380 kDa para a cultivar Thap Maeo. Os perfis da cromatografia das WSP de Thap Maeo parecem ser mais reprodutíveis do que a Nanicão, talvez por apresentar uma menor viscosidade nas concentrações aplicadas.

Como a metodologia de cromatografia de exclusão não possibilita trabalhar com grandes volumes de amostra, alternativamente foi testada a ultrafiltração por fluxo tangencial. A partir das extrações das WSP de

ambas as cultivares, as mesmas foram pesadas e diluídas em 500 ml de água deionizada. Isso foi especialmente importante, pois as soluções de WSP de ambas as cultivares são viscosas a partir de 1,5% (v/v) e para evitar pressão interna alta (*backpressure*) e desligamento da bomba foi necessário diluir mais as frações, apenas respeitando o fluxo máximo permitido pelo cassete ($50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Após o processo de ultrafiltração, todo o material retido pela membrana de 50 kDa foi retirado do cassete e liofilizado e realizada a separação por troca iônica. Devido ao rendimento das frações polissacarídicas menores que 50 kDa ter sido muito baixo, optamos por não utilizar as frações de menor peso molecular. As quantidades médias de polissacarídeos de cada cultivar após a ultrafiltração estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidades médias de polissacarídeos obtidas da ultrafiltração de WSP das cultivares Nanicao e Thap Maeo, com injeção de material inicial de 200 e 115 mg, respectivamente (n=3).

Cultivar	Subfrações solúveis em água (mg)	
	$\geq 50 \text{ kDa}$	$\leq 50 \text{ kDa}$
Nanicao	$185 \pm 11,3$	$1,3 \pm 0,5$
Thap Maeo	$100 \pm 6,1$	$5,7 \pm 1,5$

Em nenhuma das amostras foram detectadas proteínas livres pelo método de Bradford e apenas as amostras das frações que passaram por tratamento térmico (HTP N e HTP T) apresentaram conteúdo médio de compostos fenólicos menor que 0,5 ($0,5 \pm 0,02$; n=9) $\text{GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ e 1,3 ($1,3 \pm 0,04$; n=9) $\text{GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ de polissacarídeo isolado das cultivares Nanicao e Thap Maeo, respectivamente, o que pode ser representativo nas

diferenças observadas nos efeitos biológicos dos cultivos celulares onde essas frações foram empregadas.

A partir desses resultados, as frações com peso molecular ≥ 50 kDa foram submetidas a purificação em coluna de troca aniônica, onde os elementos carregados positivamente (pectinas) ficaram aderidos à resina da coluna, enquanto que os de carga negativa ou neutra foram eluídos com o próprio tampão, como descrito em métodos. A fração não ligada à coluna teve rendimento extremamente baixo e com perfil cromatográfico não homogêneo, revelando uma mistura de dissacarídeos, oligossacarídeos e outros componentes não identificados por HPAEC-PAD (dados não demonstrados). Como não haveria material suficiente para realização de todos os testes, essa fração não foi considerada nesse trabalho, apesar de mostrar uma rica composição monossacarídica de arabinose e galactose, podendo ser resultante da quebra de cadeias laterais maiores presentes nas frações ou de compostos como arabinogalactanos, conhecidos por efeitos imunomodulatórios e que fazem parte da composição da parede de micobactérias, por exemplo.

No caso das frações que se ligaram a resina e posteriormente foram eluídas por uma solução de 1M de NaCl, quando analisadas por HPLC-SEC, observou-se para o material de ambas as cultivares uma fração homogênea, com peso molecular variando de 75 a 625 kDa e composta por ácido galacturônico, galactose e mananos e com rendimento maior que 97,5%, permitindo os ensaios posteriores. Essa fração, denominada UFP, foi utilizada em todos os ensaios para imunomodulação, assim como para a geração da fração tratada por calor,

denominada HTP, descrita em detalhes na metodologia. As análises por hidrólise enzimática das frações UFP e HTP estão descritas a seguir.

4.2 Análise da hidrólise enzimática dos polissacarídeos UFP e HTP

A análise enzimática das frações UFP e HTP das cultivares Nanicao e Thap Maeo revelou a hidrólise de polissacarídeos com as enzimas mananase e endopoligalacturonase, como demonstrado pela liberação de oligômeros nos tempos de retenção 15 e 30 min, respectivamente, o que não ocorreu com o uso das enzimas arabinanase, xilanase e xiloglicanase. Também foi possível observar que após o tratamento térmico as frações HTP sofreram despolimerização em relação as frações UFP. As análises dos dados mostram a presença de homogalacturonanos, mananos e glicogalacturonanos (SANSONE et al., 2016). O resultado das análises das frações UFP e HTP estão representadas nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura. 3. Perfil cromatográfico dos oligômeros liberados por hidrólise enzimática dos polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) das bananas Nanicao e Thap Maeo. Alíquotas dos UFP foram submetidas a hidrólise enzimática com mannanase, endopoligalacturonase, arabinanase, xilanase e xiloglicanase e os perfis de oligômeros liberados após hidrólise foram analisados por HPAEC-PAD. A linha laranja corresponde ao perfil da amostra controle sem tratamento enzimático, enquanto a linha preta representa o perfil da amostra após o tratamento enzimático.

Figura. 4. Perfil cromatográfico dos oligômeros liberados por hidrólise enzimática dos polissacarídeos tratados por processamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo. Alíquotas dos HTP foram submetidas a hidrólise enzimática com mannanase, endopoligalacturonase, arabinanase, xilanase e xiloglicanase e os perfis de oligômeros liberados após hidrólise foram analisados por HPAEC-PAD. A linha laranja corresponde ao perfil da amostra controle sem tratamento enzimático, enquanto a linha preta representa o perfil da amostra após o tratamento enzimático.

4.3 Ensaio de viabilidade e citotoxicidade das frações polissacarídicas

Para realização dos ensaios com os macrófagos murinos e humanos, foram determinadas as concentrações de carboidratos nas amostras que foram extraídas, purificadas e liofilizadas. As frações polissacarídicas isoladas das cultivares Nanicão e Thap Maeo foram diluídas em água livre de endotoxinas para concentração de 1 a 2 mg.ml⁻¹, de acordo com o grau de viscosidade da amostra. Após as dosagens, foi realizado o cálculo para saber se as quantidades disponíveis seriam suficientes para todas as frações em três concentrações diferentes (10, 50 e 200 µL.ml⁻¹).

Na sequência foram feitos testes para detecção de endotoxinas. A curva de calibração do kit foi realizada com endotoxina fornecida pelo fabricante e os valores de concentração de endotoxina encontrados nas amostras estão na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração de endotoxinas detectadas pelo KIT LAL LONZA nas frações de polissacarídeos na presença e na ausência de inibidor de β-glicanos.

Cultivar	Frações	Concentração de Endotoxina (EU.ml ⁻¹)	
		sem inibidor	com inibidor
Nanicão	WSP	3,0	0,02
	UFP	3,2	0,02
	HTP	2,9	0,02
Thap Maeo	WSP	1,8	0,02
	UFP	3,1	0,02
	HTP	3,0	0,02

Apesar de inicialmente as amostras apresentarem leituras de até 3,2 EU.ml⁻¹ de endotoxina, logo que foi realizada a primeira diluição notou-se o aumento ao invés da diminuição dos valores, o que pelo fabricante do kit indica presença de β -glicanos, hemicelulose e/ou celulose. Desse modo, o ensaio foi repetido na presença de inibidor de β -glicano e após o tratamento todas as frações passaram a ter valores de 0,02 EU.ml⁻¹, ou seja, níveis quase indetectáveis de endotoxina. Dessa forma, qualquer alteração produzida nos macrófagos pelas frações polissacarídicas pode ser atribuído à molécula *per se*, e não pela presença de endotoxinas.

Uma vez confirmada a ausência de endotoxina, os testes com as frações polissacarídicas foram realizados em triplicatas biológicas e técnicas (n=9), incluindo os controles positivo (LPS) e negativo (somente meio completo), utilizando macrófagos murinos RAW 264.7, macrófagos humanos TPM e células HL-60 semeadas em microplacas de 96 poços a uma concentração de 5.10⁴ células.poço⁻¹, em volume total de 200 μ L.poço⁻¹, todas as linhagem foram repicadas nesta concentração com propósitos de comparação entre as linhagens diferentes. Conforme descrito em métodos, os testes de toxicidade foram feitos 24h e 72h após a exposição aos polissacarídeos e ao LPS. Após 24h, a maioria das frações testadas não apresentaram sinais de toxicidade frente aos macrófagos RAW 264.7 como demonstrado pela viabilidade superior a 90% quando comparado com as células controle, com exceção das frações HTP N e HTP T nas concentrações de 200 μ g.ml⁻¹ onde a

viabilidade foi menor que 90% nas primeiras 24h de incubação (Figura 5) para os macrófagos oriundos de monócitos THP-1 diferenciados por PMA (TPM) e para os monócitos sem tratamento (dados não representados) nenhuma fração foi considerada tóxica (Figura 6) e, para as células HL-60, todas as frações nas três concentrações apresentaram citotoxicidade intensa nas primeiras 24 h com exceção das frações WSP N 10, WSP T 10 e HTP T 10 que apresentaram valores semelhantes ao controle negativo e, portanto, foi realizado apenas o ensaio de citotoxicidade em conjunto com a droga antitumoral doxirubicina (Figura 7).

A partir desses dados, as concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ foram utilizadas para os testes de imunomodulação *in vitro*. (PERES; CURI, 2005) nas linhagens onde a viabilidade foi superior a 90%.

Figura 5. Teste de viabilidade de macrófagos RAW 264.7 tratados com PNAs de bananas. Os macrófagos foram incubados com apenas o meio de cultura (CTL) ou o meio de cultura adicionado de (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) nas bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹ por 24 h (cinza claro) e 72 h (cinza escuro). A viabilidade abaixo de 90% nas primeiras 24 horas foi indicativo de efeito tóxico. Os dados estão representados pela média ± DP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005. NS: não significante.

Figura 6. Teste de viabilidade de macrófagos diferenciados por 5 ng.mL^{-1} PMA oriundos de monócitos THP-1 tratados com PNAs de bananas. Os macrófagos foram incubados com apenas o meio de cultura (CTL) ou o meio de cultura adicionado de (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) nas bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h (cinza claro) e 72 h (cinza escuro). A viabilidade abaixo de 90% nas primeiras 24 horas foi indicativo de efeito tóxico. Os dados estão representados pela média $\pm$ DP ($n=9$) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005. NS: não significante.

Figura 7. Teste de viabilidade de células HL-60 tratadas com PNAs de bananas. Os macrófagos incubados apenas com o meio de cultura (CTL) ou meio de cultura adicionado de 1 mg.ml⁻¹ de doxorubicina (DX), foram considerados controle negativo e positivo, respectivamente. Além disso, foi adicionado o meio de cultura aos (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) nas bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹ por 24 h (cinza claro) e 72 h (cinza escuro). A viabilidade abaixo de 90% nas primeiras 24 horas foi indicativo de efeito tóxico. Os dados estão representados pela média $\pm$ DP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005. NS: não significante.

4.4 Determinação da atividade dos polissacarídeos sobre a produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7, macrófagos derivados por PMA oriundo de células THP-1 (TPM) e células THP-1 sem tratamento prévio

Houve estímulo importante na produção de citocinas por algumas frações polissacarídicas de ambas as cultivares, caracterizando algumas como estimulatórias enquanto outras foram mais inibitórias e houve diferença estatisticamente significativa entre os perfis dos diferentes tipos celulares estudados. Foram realizados testes para citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, TNF- α e IFN- γ para a linhagem RAW 264.7 e para as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- α para os macrófagos e monócitos derivados de THP-1, além da dosagem de óxido nítrico para as três frações. O ensaio de inibição da produção de óxido nítrico foi realizado apenas nas células oriundas da linhagem THP-1 pela falta de material e por não haver tempo hábil para repetir os testes com a linhagem RAW 264.7. As células nas três linhagens foram semeadas a concentração de $2 \cdot 10^6$ células.ml⁻¹ para fins de comparação, de modo a revelar se entre os tipos celulares houve diferença estatística entre os resultados das três linhagens testadas (ANOVA, n=9, p<0.005). Os resultados da dosagem de citocinas e do óxido nítrico pelas diferentes populações celulares estão relatadas a seguir.

4.4.1 Macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos murinos foram testados para as interleucinas-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ após exposição inicial aos polissacarídeos nas três concentrações estabelecidas. Essa análise revelou que não houve produção estatisticamente significativa das interleucinas-1 β , IL-10, IL-12 e IFN- γ estimuladas pelas frações polissacarídicas, portanto somente foram representadas as IL-6 e TNF- α .

A fração WSP da cultivar Nanicão apresentou produção de TNF- α decrescente conforme a concentração do polissacarídeo aumentava, sendo concentração dependente (Figura 8); o inverso ocorreu com a fração WSP da cultivar Thap Maeo, em que o aumento de concentração aumentou a produção de TNF- α proporcionalmente. Nas frações UFP de ambas as cultivares, as concentrações de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ produziram maior quantidade de TNF- α , observando uma inversão de produção na cultivar Thap Maeo quando comparada à fração WSP, inibindo a produção dessa citocina de forma concentração dependente. Já as frações tratadas pelo calor HTP tiveram produção expressiva de TNF- α em ambas as concentrações testadas, com perfil diferente das frações WSP e UTP.

Nas três frações WSP, UFP e HTP isoladas da cultivar Nanicão houve estímulo intenso à produção de IL-6, de modo concentração dependente e sendo que nas frações polissacarídicas WSP e UFP nas concentrações e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, a produção de IL-6 foi 300% maior quando comparadas ao controle estimulado por 2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de LPS (Figura 9).

Figura 8. Produção de TNF- α pelos macrófagos RAW 264.7 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ DP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significativo.

Figura 9. Produção de IL-6 pelos macrófagos RAW 264.7 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9) e o teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significativo.

Já nas frações oriundas da cultivar Thap Maeo, a WSP não estimulou a produção de IL-6 em nenhuma das concentrações testadas e produziram em pequena quantidade, apesar de estatisticamente significativa, nas frações UFP e HTP (Figura 10).

Figura 10. Produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos RAW 264.7 incubados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9) expressos NO_2^- mM. O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, **** < 0.0001. NS: não significante.

4.4.2 Macrófagos diferenciados por PMA oriundos de THP-1 (TPM)

Os macrófagos utilizados neste teste foram previamente diferenciados por 48h pelo PMA a uma concentração de 5 ng.ml^{-1} . Após esse período, foram verificadas características morfológicas de

macrófagos como aderência ao suporte de cultivo, aumento da relação núcleo citoplasma, além de espraiamento e formação de dendrócitos. Os macrófagos TPM foram expostos da mesma maneira que os macrófagos RAW 264.7 às frações polissacarídicas e então testados com o kit de citocinas inflamatórias humanas para IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- α . Para esta linhagem também foi realizada a determinação indireta da produção de óxido nítrico, além de um ensaio de inibição da produção deste.

As frações WSP da cultivar Nanicão induziram de forma discreta a produção de IL-1 β independente da concentração testada (Figura 11), enquanto as WSP da cultivar Thap Maeo não estimularam ou inibiram sua produção por completo. Nas frações UFP, ambas as cultivares estimularam a produção de IL-1 β de forma concentração dependente, sendo que a cultivar Nanicão teve sua produção até 400% maior que a Thap Maeo. Nas frações HTP, a cultivar Nanicão produziu de forma expressiva em todas as concentrações testadas, já na cultivar Thap Maeo, a fração HTP mostrou inibir a produção de IL-1 β de forma decrescente em relação a concentração utilizada.

A produção de IL-6 pelas frações WSP (Figura 12) de ambas as cultivares, com exceção da WSP N 10, foi muito baixa e discreta quando comparada ao controle positivo, apesar de serem significantes estatisticamente. O efeito estimulatório mais intenso ocorre nas frações UFP e HTP da cultivar Nanicão, em que a produção passa a ser concentração- dependente e com estímulo mais significativo, ao contrário

Figura 11. Produção de IL-1β pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 μg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significativo.

dos PNAs da cultivar Thap Maeo, que apesar da produção de IL-6, esta ocorreu de forma menos evidente quando comparada com a cultivar Nanicão, mostrando, mais uma vez, o seu efeito inibidor ou não estimulatório nessa linhagem celular.

Figura 12. Produção de IL-6 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.mL⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

As frações WSP da cultivar Thap Maeo induziram a produção de quimiocina IL-8 de modo concentração dependente (Figura 13) enquanto que para a cultivar Nanicao as frações WSP tiveram um estímulo fraco, induzindo IL-8 de forma menos evidente que a fração WSP T na menor concentração testada. Nas frações UTP, esse efeito foi inverso e, independente da concentração utilizada, a cultivar Nanicao foi capaz de estimular a liberação de IL-8 intensamente, demonstrando que, possivelmente, moléculas neutras e/ou negativas e/ou de baixo peso molecular presentes nas WSP possam estar inibindo a produção desta quimiocina. A fração UFP pertencente a cultivar Thap Maeo, induziu a produção de IL-8, mas sem efeito concentração dependente. Nas frações HTP de ambas as cultivares, as concentrações de $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ foram as mais estimulatórias. Esse fato é interessante, pois, provavelmente, a despolimerização dos polissacarídeos na fração UFP e/ou a exposição de compostos fenólicos nas frações HTP parecem inibir os sítios de ativação de produção dessa quimiocina.

As frações WSP de ambas as cultivares induziram a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, com exceção às frações WSP N10 e WSP N50 que resultaram em produção similar ao controle negativo (Figura 14). A fração UFP da cultivar Nanicao estimulou a produção da citocina IL-10 de forma similar ao controle positivo induzido pelo LPS, enquanto que a da cultivar Thap Maeo induziu a produção estatisticamente significativa apenas nas concentrações de 10 e $200 \mu\text{g.ml}^{-1}$, com produção 50% inferior quando comparada a cultivar Nanicao. Já nas frações HTP, ambas

as cultivares estimularam produção expressiva de IL-10, principalmente na concentração de 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Figura 13. Produção de IL-8 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significativo.

Figura 14. Produção de IL-10 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Nenhuma das frações pareceu exercer efeito intenso na produção de IL-12p70 (Figura 15). Apesar de normalmente ela estar associada aos linfócitos T, NK e a produção de IFN- γ e TNF- α , algumas frações polissacarídicas de banana induziram a produção de IL-12p70 por macrófagos. As demais frações não foram capazes de induzir ou inibiram sua produção, mesmo quando o perfil de outras citocinas inflamatórias estão presentes, como no caso de IL-6 e TNF- α observadas na cultivar Nanicão.

As frações WSP da cultivar Nanicão não foram capazes de estimular a produção de TNF- α enquanto que as frações WSP da cultivar Thap Maeo nas concentrações de 10 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ induziram uma quantidade significativa (Figura 16). Este quadro se inverte nas frações ultrafiltradas UFP, onde as oriundas da cultivar Nanicão produziram intensamente TNF- α , enquanto que as da cultivar Thap Maeo tiveram a produção suprimida. Por outro lado, após o tratamento térmico, as frações HTP foram capazes de estimular a liberação de TNF- α de forma independente da concentração utilizada.

A relação TNF- α /IL-10 nos macrófagos TPM estimulados pelo LPS foi de 104,53 e no controle negativo de 5,11. Nas frações PNAs testadas de ambas as cultivares os valores foram inferiores a 26, chegando a valores menores que 1 nas frações WSP da cultivar Nanicão e nas frações UFP da cultivar Thap Maeo.

Figura 15. Produção de IL-12p70 pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.

Figura 16. Produção de $\text{TNF-}\alpha$ pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Ao contrário dos macrófagos RAW 264.7, todas as frações polissacarídicas testadas foram capazes de estimular a produção de NO em concentrações que variaram de 0,25 até 1,0 mM NO_2^- . As frações da cultivar Nanicão produziram quase o dobro de NO em relação as frações da cultivar Thap Maeo, independente da concentração analisada (Figura 17).

Após o ensaio de inibição da produção de NO por L-NMA, todas frações não conseguiram mais induzir estímulo para produção de óxido nítrico nos macrófagos TPM, com exceção das frações WSP T 200, UFP T 10 e HTP N 200, que produziram mesmo em quantidades ínfimas, mas estatisticamente significantes em relação ao controle negativo, o que demonstra que nesta linhagem celular praticamente todo NO produzido é oriundo da síntese iNOS dependente (Figura 18).

Figura 17. Produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos TPM tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP ($n=9$) expressos $\text{NO}_2^- \text{ mM}$. O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Figura 18. Ensaio de inibição de produção de NO₂⁻ pelos macrófagos TPM através da incubação concomitante com 250 nM de acetato de N^G-Metil-L-Arginina com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9) expressos NO₂⁻ mM. O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, **** < 0.0001. NS: não significante.

4.4.3 Células THP-1 sem tratamento prévio

As células THP-1 sem nenhum tratamento também foram avaliadas quanto a produção de citocinas e óxido nítrico como já descrito para os macrófagos derivados por PMA oriundos dessa linhagem celular.

Conforme os resultados apresentados nas figuras a seguir, houve diferença estatística significativa entre os resultados quando comparados com os das células previamente diferenciadas em macrófagos (ANOVA, $n=9$, $p < 0.05$), mostrando que a fase de diferenciação em que a célula se encontra é outro fator a ser analisado quando se estudam polissacarídeos com potencial imunomodulador *in vitro* utilizando linhagens celulares tumorais.

As células THP-1 foram expostas às frações polissacarídicas e então o sobrenadante do cultivo celular testado para as citocinas utilizando um kit de citocinas inflamatórias humanas para IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF- α , além disso foi feita a determinação indireta da produção de óxido nítrico e inibição da produção deste através da utilização de acetato de N^G-Metil-L-Arginina.

A produção de IL-1 β pelas frações WSP de ambas as cultivares foi praticamente idêntica, em torno de 5 pg.ml⁻¹, fato que se repetiu nas frações UFP (Figura 19). A exceção foi a fração UFP N 50 que produziu o dobro dessa citocina. Nas frações HTP, a cultivar Thap Maeo se manteve com uma produção de 5 pg.ml⁻¹, enquanto que nas frações da cultivar Nanicão houve um incremento de produção nas concentrações de 10 e 200 μ g.ml⁻¹.

As células THP-1 parecem não possuir potencial de produção de IL-6 (Figura 20), já que nem o controle LPS foi capaz de induzir uma produção significativa quando comparadas aos macrófagos derivados dessa linhagem. As frações UFP e HTP da cultivar Nanicão foram as maiores indutoras da produção desta citocina, enquanto que nas frações

da cultivar Thap Maeo não ocorreu ou houve indução muito baixa na produção de IL-6 em células THP-1. A fração UFP da cultivar Nanicão, nas três concentrações utilizadas, e a fração UFP da cultivar Thap Maeo, na concentração de 200 mg.ml⁻¹, foram capazes de induzir a produção significativa de IL-6. Somente na fração HTP da cultivar Nanicão e nas três concentrações testadas foi observado produção mais intensa, sendo que a fração HTP N10 teve aumento de 600% em relação ao controle positivo com LPS 2 µg.ml⁻¹.

Figura 19. Produção de IL-1 β pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Figura 20. Produção de IL-6 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

As frações WSP da cultivar Nanicão apresentaram discreto aumento na produção de IL-8, enquanto que as WSP da cultivar Thap Maeo tiveram efeito na produção similar aos do controle positivo com LPS, independente da concentração utilizada nos testes (Figura 21). Para as frações UFP com concentração de $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ houve estímulo de produção de 2500 pg.ml^{-1} de IL-8, enquanto que para a da cultivar Thap Maeo, os UFP induziram a produção de IL-8 de modo concentração dependente, ocorrendo o mesmo com as frações processadas por tratamento térmico, porém, em níveis dobrados em relação aos anteriores. Em todas as concentrações testadas das frações HTP da cultivar Nanicão houve intensa produção de IL-8 mostrando que a despolimerização da molécula de pectina e/ou a exposição a compostos fenólicos presentes promoveu o aumento da atividade quimiotática tanto em monócitos quanto em macrófagos oriundos da linhagem THP-1.

Figura 21. Produção de IL-8 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Ao contrário dos macrófagos TPM que praticamente não produziram IL-12p70 ao serem expostos às frações polissacarídicas (Figura 22), as frações ensaiadas com as células THP-1, nas três concentrações utilizadas, foram capazes de induzir a produção de IL-12p70. Essa interleucina em especial demonstra que o estágio de maturação e diferenciação que a célula se encontra é determinante para a expressão fenotípica das interleucinas estimuladas e produzidas pela exposição aos polissacarídeos solúveis isolados da banana.

As frações WSP de ambas as cultivares estimularam a produção de IL-10 nas células THP-1 em todas as concentrações testadas de forma significativa e não dependente da concentração utilizada (Figura 23). Nas frações UFP de ambas as cultivares, houve produção estatisticamente significativa de IL-10, independente da concentração utilizada; o mesmo ocorrendo nas frações HTP.

As frações de PNA solúveis em água de ambas as cultivares não demonstraram estimular a produção de $\text{TNF-}\alpha$, apesar da diferença estatisticamente significativa observada na fração WSP T10, que teve produção muito próxima ao controle negativo. Interessante notar que, tanto em macrófagos quanto em células THP-1, o LPS não foi capaz de induzir a produção de $\text{TNF-}\alpha$, ao contrário da linhagem murina RAW 264.7, em que esta interleucina foi amplamente induzida tanto pelo LPS quanto pelos polissacarídeos. Já nas frações UFP, apenas a cultivar Nanicao mostrou produziu $\text{TNF-}\alpha$, enquanto a fração UFP da Thap Maeo não foi significativa em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 22. Produção de IL-12p70 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.mL⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Figura 23. Produção de IL-10 pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

As frações da cultivar Nanicão tratadas por calor foram as que mais estimularam a produção de $\text{TNF-}\alpha$, chegando a 100 pg.ml^{-1} na concentração de $200 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$, enquanto para cultivar Thap Maeo houve aumento na produção de $\text{TNF-}\alpha$ nas concentrações de 10 e 200 e não houve produção na concentração de $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$, inversamente ao ocorrido na fração UFP desta mesma cultivar, não havendo produção (Figura 24).

A relação $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-10}$ nas células THP-1 estimuladas pelo LPS foi de 66,66 e no controle negativo de 2,33. Na fração HTP $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ da cultivar Nanicão, a relação foi de 114, o dobro do controle, porém na fração WSP, na mesma concentração, a relação foi de 0,43. A fração HTP $200 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ da cultivar Thap Maeo foi a que mostrou a maior relação com 18,9 e a menor na fração UFP com 0,95 nas três concentrações testadas.

Em relação a produção de óxido nítrico pelas células THP-1 (Figura 25), as frações isoladas da cultivar Nanicão se mostraram mais eficazes no estímulo de produção. As três frações WSP, UFP e HTP promoveram efeitos estatisticamente significantes, sendo que as frações HTP foram as que menos estimularam sua produção. Já na cultivar Thap Maeo, todas as frações foram capazes de estimular a produção de NO, mas em níveis bem inferiores se comparados com as da Nanicão (ANOVA, $n=9$, $p<0.05$).

No ensaio de inibição de produção de óxido nítrico pelo L-NMA, todas as frações tiveram seu estímulo inibido e a produção de NO pelos monócitos se igualou a do controle negativo (Figura 26).

Figura 24. Produção de TNF- α pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanição e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média $\pm$ EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Figura 25. Produção de óxido nítrico (NO) pelos monócitos THP-1 tratados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíram o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9) expressos NO₂⁻ mM. O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significativa.

Figura 26. Ensaio de inibição de produção de NO²⁻ pelos monócitos THP-1 através da incubação concomitante com 250 nM de acetato de N^G-Metil-L-Arginina com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Macrófagos incubados somente com meio de cultura foram o controle negativo (CTL) enquanto que aqueles cultivados na presença de LPS constituíam o controle positivo (LPS). Os dados estão representados pela média ± EP (n=9) expressos NO² mM⁻¹. NS: não significante.

4.5 Avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos RAW 264.7 e TPM estimulados pelas frações polissacarídicas

A principal função dos macrófagos ativados é sua capacidade fagocítica, sendo esta a primeira linha de defesa do sistema imunológico. Os resultados do índice de fagocitose dos macrófagos murinos RAW 264.7 e dos macrófagos diferenciados por PMA oriundos de monócitos THP-1 (TPM) testados com as frações polissacarídicas estão representados a seguir.

4.5.1 Macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos murinos possuem alta capacidade fagocítica e são prontamente estimulados pelo LPS e também por algumas frações polissacarídicas testadas. Os monócitos também são células capazes de realizar fagocitose, mas para fins de comparação entre tipos celulares, somente os macrófagos foram testados quanto à capacidade fagocítica.

Nas frações WSP os macrófagos RAW 264.7 foram ativados pelos polissacarídeos da cultivar Nanicão de forma concentração dependente (Figura 27). Além disso, o polissacarídeo ativou em média 49% (49 ± 8 , $n=9$) dos macrófagos, atividade que foi estimada através da fagocitose de duas ou mais partículas de zymosan e/ou acompanhada por qualquer alteração morfológica, como espraiamento, emissão de dendróitos e aumento da relação citoplasma/núcleo.

Figura 27. Índice de Fagocitose dos macrófagos RAW 264.7 incubados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicão e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Alternativamente, os macrófagos foram incubados somente com meio de cultura mais partículas de zymosan (CTL) ou meio de cultura mais LPS constituindo os grupos controle negativo e positivo, respectivamente. Após 24 h, as partículas de zymosan foram adicionadas aos grupos controle e experimental e incubadas por 2 h adicionais. As células foram fixadas, coradas e as partículas fagocitadas foram visualizadas em microscópio óptico com aumento 400 x. O PI foi calculado assumindo o valor 0 para controle zymosan e 100 para o controle LPS. As barras negativas indicam inibição da fagocitose quando comparadas com o controle zymosan. Os dados estão representados pela média $\pm$ EP ($n=9$). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

Na WSP da cultivar Thap Maeo foi observado um efeito inverso, concentração dependente, com índice de fagocitose negativo em todas as concentrações, acompanhada por uma ativação de 30, 22 e 18% dos

macrófagos nas concentrações de 10, 50 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ respectivamente e com baixo índice de partículas fagocitadas, demonstrando inibição desta função.

Nas frações UFP da cultivar Nanicão houve ativação dos macrófagos com média de 52% ($52,11 \pm 5,8$, $n=9$), índice de fagocitose e partículas fagocitadas crescente e concentração dependente, com média de 6 partículas fagocitadas por macrófago ativado. Na cultivar Thap Maeo as frações UFP mostraram um índice de fagocitose positivo, com ativação média de 49% ($48,9 \pm 5,5$, $n=9$) dos macrófagos e um índice médio de partículas fagocitadas de 4.

Já nas frações tratadas pelo calor HTP nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, os PNAs da cultivar Nanicão apresentaram índice de fagocitose não significante, demonstrado pela baixa ativação celular ($\sim 40\%$) e em média 4 partículas fagocitadas por macrófago. Para a cultivar Thap Maeo o índice de fagocitose concentração dependente aumentou em 61 e 77%, com ativação de 48 e 53% e partículas fagocitadas de 6 e 7 por macrófago nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ respectivamente, ou seja, somente nesta fração houve inversão dos efeitos observados para outras frações (WSP e UFP), mostrando o provável efeito da despolimerização das moléculas e/ou a presença de fenólicos na amostra.

4.5.2 Macrófagos diferenciados por PMA oriundos de THP-1 (TPM)

Os macrófagos TPM mostram ativação da capacidade fagocítica quando expostos a maioria das frações (Figura 28), com as exceções de

WSP N10, UFP N 10, UFP T 10, 50 e 200 que mostraram inibição ou não apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas ao controle negativo.

Figura 28. Índice de Fagocitose dos macrófagos TPM incubados com (A) polissacarídeos solúveis em água (WSP), (B) polissacarídeos ultrafiltrados (UFP) ou (C) polissacarídeos com tratamento térmico (HTP) das bananas Nanicao e Thap Maeo em concentrações de 10, 50 e 200 µg.ml⁻¹. Alternativamente, os macrófagos foram incubados somente com meio de cultura mais partículas de zymosan (CTL) ou meio de cultura mais LPS constituindo os grupos controle negativo e positivo, respectivamente. Após 24 h, as partículas de zymosan foram adicionadas aos grupos controle e experimental e incubadas por 2 h adicionais. As células foram fixadas, coradas e as partículas fagocitadas foram visualizadas em microscópio óptico com aumento 400 x. O PI foi calculado assumindo o calor 0 para controle zymosan e 100 para o controle LPS. As barras negativas indicam inibição da fagocitose quando comparadas com o controle zymosan. Os dados estão representados pela média ± EP (n=9). O teste t Student foi utilizado para determinar significância estatística entre os grupos controle e experimentais. p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significativa.

As frações WSP e UFP de ambas as cultivares apresentaram porcentagem de ativação de macrófagos muito semelhantes, com média de 48,2% ($48,2 \pm 3,13$, $n=9$) para as da cultivar Nanicão e 41% ($41,11 \pm 2,68$, $n=9$) para as da cultivar Thap Maeo e o número médio de partículas fagocitadas 6 e 4, respectivamente. Já nas frações tratadas por calor HTP houve aumento significativo quando comparados aos outros tratamentos ($49,3 \pm 3,9$, $n=9$) não dependente da concentração e foram os mais eficazes quanto à fagocitose, com exceção da fração HTP N na concentração de $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, que, apesar de ser positivamente significativa frente ao controle negativo ($14,83 \pm 2$, $n=9$), teve seu índice de fagocitose bem inferior quando comparada com as concentrações de 10 e $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ($58,26 \pm 6,9$ e $69,79 \pm 2$, $n=9$, respectivamente) desta mesma cultivar. Nas frações HTP da cultivar Nanicão, a ativação de macrófagos foi decrescente conforme a concentração de polissacarídeo aumentou e o inverso ocorreu na cultivar Thap Maeo, assim como para partículas fagocitadas e índice de fagocitose.

4.6 Marcadores de superfície celular expressos em células THP-1 após tratamento com as frações polissacarídicas

As células THP-1 foram cultivadas por 24h juntamente com as frações polissacarídicas na concentração de $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, LPS na concentração de $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e GM-CSF na concentração de $800 \text{ U}.\text{ml}^{-1}$, sendo posteriormente testadas com anticorpos monoclonais específicos para os marcadores de superfície (Tabela 5) CD14, CD33, CD11c, CD123, TLR-2 e TLR-4.

Tabela 5. Porcentagem dos marcadores celulares expressos na superfície de células THP-1 cultivadas por 24h na presença das frações polissacarídicas WSP, UFP e HTP de ambas as cultivares na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O LPS (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi utilizado como indutor de TLR-4, enquanto o GM-CSF (800 U.mL^{-1}) como marcador de proliferação de todos marcadores testados. Para o controle negativo foram utilizadas as células THP-1 cultivadas em meio completo somente. A estatística foi realizada aplicando o teste t Student não-pareado (n=3) tendo como referência o controle negativo e os valores estão representados em porcentagem de expressão de células marcadas dentro do *gate* de células viáveis e contados 10.000 eventos por amostra. p-Valor * < 0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001. NS: não significante.

% Marcadores de Superfície Celular Expressos em Células THP-1

TRATAMENTO	CD14	CD33	CD11c	CD123	TLR-2	TLR-4
NEGATIVO	14,97 $\pm$ 1,65	92,46 $\pm$ 0,05	91,76 $\pm$ 0,37	92,35 $\pm$ 0,065	91,73 $\pm$ 0,08	73,65 $\pm$ 1,81
LPS	34,92 $\pm$ 0,31 ***	69,17 $\pm$ 1,17 ****	65,41 $\pm$ 2,78 ***	68,42 $\pm$ 1,11 ****	68,67 $\pm$ 1,26 ****	67,3 $\pm$ 1,0 *
GM-CSF	96,80 $\pm$ 0,19 ****	96,86 $\pm$ 0,22 ****	92,28 $\pm$ 0,71 NS	96,92 $\pm$ 0,27 ****	96,80 $\pm$ 0,19 ****	90,37 $\pm$ 2,18 **
WSP NANICÃO	33,37 $\pm$ 9,2 NS	74,88 $\pm$ 0,68 ****	67,19 $\pm$ 3,9 **	74,94 $\pm$ 0,75 ****	74,68 $\pm$ 0,62 ****	72,54 $\pm$ 0,74 NS
WSP THAP MAEO	24,64 $\pm$ 6,91 NS	70,27 $\pm$ 1,48 ***	63,53 $\pm$ 2,26 ***	70,46 $\pm$ 1,43 ***	69,63 $\pm$ 1,71 ***	59,64 $\pm$ 5,1 NS
UFP NANICÃO	24,75 $\pm$ 1,52 *	37,97 $\pm$ 0,48 ****	29,85 $\pm$ 4,1 ***	38,41 $\pm$ 0,4 ****	37,88 $\pm$ 0,44 ****	38,09 $\pm$ 0,44 ****
UFP THAP MAEO	34,47 $\pm$ 3,47 *	70,69 $\pm$ 1,99 ***	60,25 $\pm$ 6,31 **	70,93 $\pm$ 2,0 ***	70,61 $\pm$ 1,99 ***	68,46 $\pm$ 2,72 NS
HTP NANICÃO	43,13 $\pm$ 1,62 **	71,47 $\pm$ 0,87 ****	69,87 $\pm$ 0,502 ****	71,51 $\pm$ 0,9 ****	71,11 $\pm$ 1,99 ****	68,46 $\pm$ 2,72 NS
HTP THAP MAEO	33,78 $\pm$ 1,35 **	75,48 $\pm$ 1,27 ***	73,3 $\pm$ 0,462 ****	75,48 $\pm$ 1,3 ***	75,32 $\pm$ 1,23 ***	73,69 $\pm$ 1,18 NS

A análise da complexidade (SSC – *Side Scatter Complexity*) e tamanho celular (FSC - *Forward Scatter Complexity*) está na Figura 29. O *gate* foi realizado conforme a população representativa das células THP-1 viáveis. As médias de fluorescência foram calculadas para que fosse possível observar qualquer tipo de aumento no tamanho ou complexidade celular, indicativo do processo de diferenciação, como representado na Figura 30. A estatística foi feita comparando sempre o grupo tratado com o controle negativo, ou seja, as células somente em meio completo (RPMI 1640 + 10% SFB) utilizando o teste t de Student não-pareado. No caso da análise do tamanho celular também foi realizada a comparação entre as cultivares significantes para saber qual se diferenciou mais em relação a outra.

Figura 29. Gráfico de dispersão mostrando a análise do tamanho e complexidade das células THP-1 ($2 \cdot 10^5$ células. ml^{-1}) sem tratamento e tratadas durante 24h em meio RPMI 1640 + 10% SFB suplementado com LPS ($2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), GM-CSF ($800 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) e as frações polissacarídicas WSP, UFP e HTP das cultivares Nanicão e Thap Maeo ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Figura 30. Gráfico representando a média de intensidade de fluorescência (MFI) do parâmetro Forward Scatter Complexity (FSC) que mede o tamanho celular adquirido no *gate* da série granulocítica com 10.000 eventos contados por amostra (n=9). As células foram incubadas por 24h sendo as negativas THP-1 sem tratamento, e as tratadas com LPS (2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), GM-CSF (800 $\text{U}.\text{ml}^{-1}$) e as frações polissacarídicas WSP, UFP e HTP de ambas as cultivares Nanicão (N) e Thap Maeo (T) na concentração de 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Um aumento na intensidade desse parâmetro é indicativo do aumento da relação citoplasma/núcleo, demonstrando que as células estão saindo do estado indiferenciado para um mais maduro. A estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado comparando as frações testadas com o controle negativo. As barras horizontais representam a comparação pelo mesmo teste estatístico entre as cultivares Nanicão e Thap Maeo (n=9). p-Valor * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.0001. NS: não significante.

5. DISCUSSÃO

No processo de extração dos PNAs da polpa de bananas, houve o mínimo de interferência na amostra, sem utilização enzimática, somente utilizando solventes e ultrassom, com objetivo de obter as moléculas na forma mais preservada possível, utilizando apenas as frações hidrossolúveis de ambas as cultivares.

As atividades dos polissacarídeos sempre mostram forte relação com sua massa molecular, composição de monossacarídeos, configuração e posição das ligações glicosídicas e até da conformação de tripla hélice. Portanto, a determinação destas propriedades físicas e químicas dos polissacarídeos se torna necessária para elucidação dos mecanismos envolvidos na modulação de células imunes (GUAN; LI, 2010). Em solução, os polissacarídeos podem exibir diferentes conformações, como em hélice (tripla ou simples) ou mola aleatória, que pode ser mais ou menos rígida. Estas características estruturais podem influenciar o contato direto entre os polissacarídeos e as células ou outros componentes do sistema imune e possivelmente resultando em atividades imunoestimulatórias (FERREIRA et al., 2015).

A constituição monossacarídica dos PNAs de ambas as cultivares apresentou quantidade expressiva de ácido galacturônico e manose, o que mostra a presença de homogalacturonanos, galactomananos e mananos, e que foi confirmado através da digestão enzimática dessas frações e posterior análise de seus oligômeros liberados. Nas frações WSP de ambas as cultivares houve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens molares de Glc UA, Rha, Gal, Glc, Xyl, Gal UA, enquanto os monossacarídeos Fuc, Ara e Man tiveram

porcentagens similares e sem diferença estatística. Ainda assim, a composição de ambas as frações WSP são mais similares entre si do que frações UFP e HTP quando comparadas entre as cultivares.

Em ambas as WSP foram encontradas arabinose e galactose, o que sugere a presença de polissacarídeo do tipo arabinogalactano, porém, em quantidades muito baixas e não possível de ser purificadas para uso nos testes. Nas frações UFP e HTP da cultivar Thap Maeo, observou-se concentração molar mais alta de arabinose quando comparada às das frações obtidas da Nanicão que provavelmente faz parte de ramificações do esqueleto principal da molécula, outra característica que pode ser responsável pelos diferentes efeitos imunomoduladores entre as cultivares. Além disso, podem haver polissacarídeos de baixo peso molecular como os xiloglicanos, encontrados nas frações WSP e inexistentes nas frações UFP e HTP, ou arabinogalactanos que não estavam presentes nas frações ácidas ou ainda compostos fenólicos associados aos PNAs nas frações HTP, que mesmo em baixa concentração podem exercer efeitos sobre células do sistema imunológico (SHIGA et al., 2017). Todas essas classes de polissacarídeos já tiveram seus efeitos imunomoduladores comprovados em outras fontes alimentares (KELLY, 1999; RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SCHEPETKIN et al., 2005; UDANI et al., 2010).

A tentativa de fazer uma triagem inicial dos PNAs por cromatografia de exclusão por tamanho resultou em baixos rendimentos e longos tempos de execução de cada corrida (24h). O grande problema na utilização dessa técnica é que foi necessário fazer diversas injeções para obter amostras de cada fração com rendimento muito baixo. Além disso, foi necessária mais uma etapa de diálise de 72h para eliminação do tampão de corrida, o que acarretou em mais perda de

material. As pectinas da banana de ambas as cultivares apresentam viscosidade muito alta quando em solução aquosa, mesmo em concentrações baixas, o que pode entupir a coluna, compactar a resina e/ou levar a pressão contrária ao fluxo, prejudicando a resolução da separação.

Em contraposição, a ultrafiltração possibilitou processar grandes volumes (até 500 ml.h⁻¹) em menor tempo, e com rendimento quase 100 vezes superior a separação cromatográfica, além de eliminar mais uma etapa de diálise para remoção do tampão de corrida.

Os cromatogramas das frações WSP revelam ampla faixa de tamanho de polissacarídeos, sendo os de peso molecular ≥ 50 kDa os mais abundantes em ambas as cultivares, havendo concordância com o resultado da ultrafiltração. O rendimento das frações abaixo de 50 kDa obtidas pela metodologia de ultrafiltração foi muito baixo, sendo que na cultivar Nanicão essa fração representava apenas 0,73% da amostra injetada no cassete, enquanto na cultivar Thap Maeo essa mesma fração representava 2,5%. Foi interessante notar para a cultivar Thap Maeo que após a separação das frações por ultrafiltração em faixas moleculares maiores ou menores que 50 kDa, ambas perderam a capacidade de formar soluções viscosas nas concentrações utilizadas, o que não ocorreu na cultivar Nanicão e, talvez por isso, essa cultivar apresentou maior rendimento nesta metodologia.

Após a análise das frações previamente purificadas em coluna de troca aniônica, ficou evidente que a fração ácida era, além de mais abundante, a mais homogênea com faixa de peso molecular de 75 a 625 kDa e composta por polímeros de ácido galacturônico, como homogalacturonanos, xilogalacturonanos e glicogalacturonanos, além de mananos de acordo com os resultados da hidrólise

enzimática, enquanto que as frações com carga negativa e/ou neutra representavam oligômeros compostos de arabinose e galactose, basicamente, mas que devido ao baixo rendimento não foi possível analisar os seus efeitos de forma isolada e, portanto, não foram consideradas neste trabalho. Enquanto grupamentos acetil promovem a formação de bolsões hidrofóbicos nos polissacarídeos, os sulfatos provêm carga negativa. Dependendo dos padrões e tipos substituintes, respostas imunoestimulatórias diferentes podem ser desencadeadas. Assim, além da origem e do tipo do polissacarídeo, conformação, peso molecular, presença de grupos funcionais como acetil e sulfato e grau de ramificação da molécula, estão conectados ao tópico imunológico (FERREIRA et al., 2015).

As frações UFP e HTP apresentaram o mesmo perfil cromatográfico e de hidrólise enzimática, com a diferença que os polímeros encontrados na fração HTP tiveram grau de polimerização menor, o que pode ter sido promovido pela quebra das ligações de hidrogênio através do processamento térmico. Sugere-se portanto, que os efeitos observados nas frações UFP são decorrentes da ação das classes de polissacarídeos citadas, enquanto que a diferença dos efeitos observados nas frações UFP e HTP se dão devido à exposição de fenólicos e/ou despolimerização das moléculas de pectinas ácidas e comparados com as frações WSP esses efeitos podem ser decorrentes de outras moléculas polissacarídicas, como arabinogalactanos, ou, ainda, pelos polissacarídeos de baixo peso molecular eliminados nas frações UFP e HTP como os xilogalacturonanos e xilomananos.

Quando se trabalha com cultivos celulares de macrófagos e de outras células do sistema imune é de suma importância a detecção de endotoxinas (LPS ou proteína associada ao lipídeo A), já que essas moléculas são imunomoduladoras e têm afinidade pelos receptores *Toll like*, desencadeando a

produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α , por exemplo) em concentrações tão baixas quanto 1 EU.mg⁻¹ de material (WISMAR et al., 2011). De fato, há relatos de efeitos importantes na expressão de citocinas em macrófagos ensaiados com preparações de polissacarídeos. A presença de LPS em amostras foi observada no estudo feito por Wismar et al. (WISMAR et al., 2011) em que preparações de curdlano mostraram forte poder imunoestimulador *per se*, porém, quando testadas para endotoxinas, revelaram estar com uma carga de 100 EU.mg⁻¹, o que equivale a 4 ng.ml⁻¹ de LPS. Por outro lado, outras substâncias com efeito pronunciado na produção de citocinas foram testadas para endotoxinas e detectadas menos de 0,6 EU.mg⁻¹ de LPS, sendo esta concentração insuficiente para produção significativa de TNF- α e IL-6.

Todas as amostras testadas no presente trabalho tiveram leituras muito próximas ao controle negativo, que consiste em água reagente LAL com nível de endotoxina menor que 0,005 EU.ml⁻¹. Nesse caso, o principal cuidado é quanto à presença de β -glicanos e derivados que podem interferir na reação, dando resultado falso positivo. Alguns trabalhos fazem um comparativo entre cultivos contendo LPS e/ou endotoxinas juntamente com as substâncias estudadas, porém, nesses casos o que se espera observar é o sinergismo entre o LPS e/ou endotoxina e a substância testada e não se a substância tem o poder de ativar os macrófagos *per se*.

Quando realizado o teste de viabilidade celular com as frações de polissacarídeo de banana, foi observado aumento do número celular em diversas frações e em diferentes concentrações em relação ao grupo controle só contendo meio completo, corroborando o efeito mitogênico dos BRMs *in vitro* nos macrófagos RAW 264.7. Porém, esse efeito não foi observado nas células THP-1 sem

diferenciação prévia. As células RAW 264.7, THP-1 diferenciadas em macrófagos e THP-1 monocíticas se mostraram resistentes e viáveis a qualquer efeito citotóxico que os polissacarídeos poderiam causar, mantendo a viabilidade das células acima de 90% em todas as frações, com exceção das frações HTP N e HTP T testadas em macrófagos RAW 264.7 que tiveram perda de viabilidade superior a 10% na concentração de 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Possivelmente, isso foi devido à despolimerização e/ou desramificação da pectina e/ou exposição de compostos fenólicos livres que são mais tóxicos para as células, ou ainda, pelo aumento do *burst* respiratório dos macrófagos causado pela ação dos polissacarídeos e/ou consumo excessivo dos nutrientes do meio. Por outro lado, a fração WSP de Thap Maeo, mesmo após 72h de incubação, apresentou viabilidade considerável nas três concentrações (75%~62%) e a fração HTP T na concentração de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ também apresentou viabilidade celular em torno de 67% em macrófagos RAW 264.7. Esse fato é interessante, pois, através de um mecanismo não identificado, as células que foram estimuladas em um primeiro momento não foram degradadas pelo metabolismo, mecanismos de apoptose e/ou autofagia. Além disso, podemos observar que houve aumento no número de macrófagos (4 a 13%) na maioria das concentrações testadas com os PNA sem relação aos não-tratados, indicando que provavelmente houve estímulo pelos polissacarídeos, o que foi corroborado pelo ensaio de fagocitose.

Nas células HL-60, todas as frações polissacarídicas de ambas as cultivares foram citotóxicas em todas as concentrações testadas causando a morte celular média de 14-71% para as preparações obtidas dos PNAs da cultivar Nanicão e 11-68% para os PNAs da cultivar Thap Maeo nas primeiras 24h, sendo que o controle com a droga antitumoral doxorubicina causou a morte celular de 75% da população

inicial. Após 48h, tanto o controle positivo quanto os testes com as frações polissacarídicas não apresentavam mais células viáveis. Foi interessante notar que nas frações WSP de ambas as cultivares, o efeito citotóxico se apresentou de maneira concentração dependente sendo que o mesmo ocorreu com a fração HTP da cultivar Thap Maeo. Nas frações UFP de ambas as cultivares e na HTP da Thap Maeo não foi observado efeito dependente da concentração, porém, a fração UFP da cultivar Nanicão se mostrou a mais citotóxica, matando em média 68% das células, assim como a fração HTP da cultivar Thap Maeo, matando a mesma quantidade de células nas primeiras 24 horas. As frações WSP T 200, UFP N 10, UFP N 50, UFP N 200, UTP T 50, UTP T 200, HTP N 200, HTP T 10, HTP T 50 e HTP T 200 tiveram citotoxicidade estatisticamente semelhante a droga antitumoral doxorubicina.

O ensaio de fagocitose apresentou resultados significantes quando comparados ao estímulo pelo LPS, sendo que para a WSP de Nanicão esse efeito foi mais pronunciado, ao passo que a WSP de Thap Maeo inibiu a fagocitose quando comparadas com o controle negativo. Este efeito, já observado na viabilidade celular, foi confirmado pelos ensaios de citocinas, sendo que nessas subfrações a produção de citocinas inflamatórias foi inibida quando comparada ao controle positivo.

As respostas das citocinas induzidas em células THP-1 quando comparadas a macrófagos oriundos desta linhagem variaram dependendo do estímulo e o grau de diferenciação do macrófago estudado. A indução de TNF- α por LPS é geralmente maior em monócitos do que em macrófagos devido ao aumento de regulação transcriptiva e translacional, apesar de alguns estudos demonstrarem uma maior produção em macrófagos (DAIGNEAULT et al., 2010), como no caso

dos RAW 264.7. Além disso, para que o complexo TLR-4 seja ativado completamente é necessário o acoplamento ao marcador de superfície celular CD14, além da proteína MD2, que faz a ponte citosólica para ativação da cascata produtora de TNF- α (ERRIDGE et al., 2008).

As frações de polissacarídeos testadas em macrófagos RAW 264.7 mostraram um efeito concentração dependente inverso para os PNAs da cultivar Nanicão em relação aos da Thap Maeo para a citocina TNF- α , enquanto para outras citocinas esse efeito foi independente da concentração testada. As diferenças entre os efeitos das frações obtidas das cultivares Nanicão e Thap Maeo são evidentes no caso das frações WSP. As subfrações que foram submetidas a tratamento térmico parecem não ter perdido suas funções imunomoduladoras, e em alguns casos essas atividades se encontravam exacerbadas.

O LPS *per se* é capaz de estimular a produção de NO em monócitos humanos, mas quando adicionado sozinho nos ensaios *in vitro* sem estímulo adicional para produção de citocinas, é insuficiente para induzir a enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS-2 ou iNOS) e, portanto, não há quase produção de NO em macrófagos derivados de monócitos (MACMICKING et al., 1997). Apesar da alta produção de TNF- α , houve uma produção muito baixa de óxido nítrico, talvez pela ausência de produção de IL-1 β pelos macrófagos RAW 264.7 que não possuem o inflamassomo ASC responsável pela conversão de sua forma proativa ou também pela ausência de IFN- γ (BRYAN et al., 2010). As frações HTP de ambas as cultivares não foram capazes de induzir a produção de óxido nítrico podendo-se especular que a despolimerização dos polissacarídeos ou a presença de fenólicos possam ser responsáveis por este acontecimento. A baixa produção de óxido

nítrico não significa que as células tenham capacidade inferior de *burst* respiratório, e sim que estas células estão menos propensas a desenvolver reações do tipo alérgicas, o que pode ser de interesse em se tratando do trato gastrointestinal.

A produção de TNF- α em células RAW 264.7 foi superior àquelas das células THP-1, tanto estimuladas pelo LPS quanto pelos polissacarídeos, e cada citocina testada parece ter um perfil de liberação completamente diferente de acordo com a linhagem celular utilizada, o estímulo dado e a duração deste. Como exemplo, as subfrações UFP e HTP originadas da cultivar Nanicão, estimularam de forma eficaz a produção de IL-1 β nos macrófagos THP-1, o que não ocorreu nos macrófagos RAW 264.7.

Ao contrário que se esperava pela grande produção de TNF- α pelos macrófagos RAW 264.7, poucas frações estimularam a produção de óxido nítrico enquanto outras frações testadas induziram a produção em quantidades similares ao controle negativo. Como não houve produção de IFN- γ e os macrófagos RAW 264.7 não possuem o inflamassomo ASC responsável pela conversão da pró-IL-1 β em sua forma ativa, especula-se que a produção de óxido nítrico nesta linhagem se dê por uma via que não a canônica da iNOS sintase, fato que não pode ser averiguado pela ausência de material nesta fase do projeto, porém houve produção exacerbada de TNF- α , o que poderia ter contribuído para a produção de NO pela NOS constitutiva. Os polissacarídeos da cultivar Nanicão demonstraram ser mais imunoestimuladores, enquanto os da cultivar Thap Maeo imunossupressores da cascata inflamatória nos macrófagos RAW 264.7. Estudos adicionais serão necessários para comparar as estruturas das diferentes frações.

A ativação dos macrófagos, assim como o índice de fagocitose, parece ser independente dos padrões de citocinas liberados, provavelmente por envolver receptores distintos para ativação de cada parte da cascata de sinalização, como TLR-2, TLR-4 ou receptor de manose, por exemplo. Nos macrófagos RAW 264.7, a ativação pelas frações WSP mostrou-se concentração dependente e inversamente proporcional à dosagem de $\text{TNF-}\alpha$, mostrando que esta citocina não atua isoladamente na ativação celular desencadeada pelos BRMs. Portanto, receptores como o de ligação à manose (MR/MBL) e dectina-1 podem estar envolvidos no processo de ativação da fagocitose, já que nas amostras polissacarídicas testadas havia mananos e este grupo de polissacarídeos presente em leveduras são altamente imunomoduladores, atuando em receptores TLR-2/6 (CHANDRASHEKAR; PRASHANTH; VENKATESH, 2011; DOMER; GARNER; BEFIDI-MENGUE, 1989; WISMAR et al., 2010). Esse fato pode ser observado na cultivar Thap Maeo, pois a menor produção de $\text{TNF-}\alpha$ ocorreu com ativação de 30% dos macrófagos, inferior ao controle negativo, assim como o número de partículas de zymosan fagocitadas por macrófago ativado que foram bem inferiores nas frações polissacarídicas desta cultivar comparada à Nanicão. Já nas frações HTP, a cultivar Thap Maeo mostrou resposta mais intensa, provavelmente atribuída a maior presença de compostos fenólicos encontrados nessa cultivar.

Nos macrófagos oriundos da linhagem THP-1, a $\text{IL-1}\beta$ foi produzida de forma mais eficaz pelas frações WSP e HTP da cultivar Nanicão, enquanto que as mesmas frações da cultivar Thap Maeo mostraram inibir a produção desta citocina e de forma concentração dependente. Isso permite especular que os polissacarídeos das diferentes cultivares podem estar atuando em distintos receptores e/ou vias de sinalização envolvidos na produção da $\text{IL-1}\beta$. No caso da

IL-6, os polissacarídeos da cultivar Thap Maeo parecem ter inibido ou não estimulado a produção desta citocina, mostrando mais uma vez um perfil mais anti-inflamatório, enquanto que os polissacarídeos da cultivar Nanicão nas frações UFP e HTP tiveram uma produção expressiva e os WSP ficaram próximos ao controle negativo, demonstrando que algum componente polissacarídico de baixo peso molecular ou carga neutra e/ou negativa possa ser responsável pelo efeito inibidor da produção desta interleucina.

A IL-6 é uma citocina que não está somente envolvida na inflamação e na infecção, mas também nos processos de regulação metabólica e regenerativa. As atividades regenerativas ou anti-inflamatórias da IL-6 são mediadas pela sinalização clássica (interação com os receptores de membrana para IL-6 que se associam com a proteína gp130), enquanto que as respostas pró-inflamatórias da IL-6 são mediadas pela transsinalização (onde há necessidade da IL-6 se ligar a receptores solúveis para então se associar a gp130 e iniciar a cascata inflamatória) (SCHELLER et al., 2011). As frações WSP e UFP da cultivar Nanicão foram grandes produtoras de IL-6, enquanto que as frações WSP da cultivar Thap Maeo parecem ter inibido a produção desta citocina, voltando a estimular sua produção de forma discreta nas frações UFP. Portanto, como já comentado, a provável causa inibitória seriam as moléculas de baixo peso molecular perdidas na filtração ou polissacarídeos neutros e/ou negativos ausentes nas frações UFP.

A cultivar Nanicão apresentou correlação positiva com a produção de citocinas IL-1 β e IL-6, enquanto o contrário ocorreu nas frações da cultivar Thap Maeo, mostrando que os polissacarídeos de cada cultivar possuem ações distintas apesar de sua composição monossacarídica similar.

A produção da quimiocina IL-8 foi expressiva em todas as frações testadas, não só nos macrófagos, mas também nos monócitos THP-1, sendo que no caso da fração WSP de ambas as cultivares a produção foi concentração dependente, sendo que as frações da Thap Maeo mostraram ser mais eficazes no estímulo.

A produção intensa de IL-8 demonstra o potencial de quimiotaxia para os monócitos periféricos promovida pelo polissacarídeos não-amido, o que pode ocorrer de maneira similar quando esses polissacarídeos atingem o lúmen intestinal. Porém, devemos observar que apesar da quimiotaxia intensa, a resposta inflamatória nesta linhagem celular é bem discreta e autolimitada quando comparadas com a produção de citocinas pelos macrófagos RAW 264.7. Infelizmente, os efeitos da IL-8 não puderam ser avaliados nos macrófagos RAW 264.7 pois não havia esta citocina no kit de detecção de camundongos e não haveria material nem tempo hábil para realização desses testes, mas a comparação dos macrófagos THP-1 com os RAW 264.7 nos parâmetros de IL-6, TNF- α , óxido nítrico e índice de fagocitose mostrou diferença estatística em ambas as cultivares e em todas as frações testadas (ANOVA, $n=9$, $p<0.005$).

Nas células TPM e THP-1 estimuladas pelas frações WSP, a produção de TNF- α ocorreu de forma menos intensa assim como para as citocinas IL-1 β e IL-6 e de forma abundante nas frações HTP de ambas as cultivares. As reações inflamatórias causadas nas linhagens oriundas de THP-1 foram detectadas e parecem ter ocorrido de forma mais discreta por ter havido produção de IL-10 após estímulo das frações de ambas as cultivares. Haskó et al (1996) demonstraram que o estímulo dos receptores para adenosina modula de forma diferenciada a produção de IL-10, TNF- α e NO induzida por LPS *in vitro* e *in vivo*. O aumento da produção de IL-10 induzida pelo LPS e a supressão da produção de TNF- α e NO

causada pela ativação dos receptores para adenosina pode explicar algumas das ações imunomoduladoras da adenosina liberada em excesso durante a inflamação e/ou injúria isquêmica.

A produção de óxido nítrico se deu de formas variadas nas três linhagens utilizadas, sendo que na THP-1 foi demonstrado que sua produção foi dependente da enzima iNOS, enquanto que nos macrófagos RAW 264.7, apesar do teste de inibição para iNOS não ter sido realizado, não houve produção de IFN- γ por estas células. Assim, pode-se especular que sua produção tenha vindo da óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e não somente da iNOS. As enzimas cNOS produzem pouca quantidade de NO e depois de vários minutos após o estímulo inicial que só ocorre com elevação de íons Ca^{2+} intracelulares (MACMICKING et al., 1997).

Macrófagos, células musculares lisas, células endoteliais, hepatócitos, e miócitos cardíacos, assim como outras células que possuam atividade iNOS produzem grandes quantidades de NO que são sustentadas por longos períodos quando ativadas por estímulos incluindo LPS, IFN- γ , IL-1 β ou TNF- α . As concentrações nanomolares de NO produzidas pela cNOS são suficientes para sinalização intracelular, enquanto que o NO produzido pela iNOS nos macrófagos funciona como uma molécula de defesa com atividades citotóxica, citoestática, microbicida e microbiostática (MACMICKING et al., 1997; SINHA et al., 1998). Já é conhecido que o excesso de produção de NO pelos macrófagos e outras células expostas à endotoxinas pode contribuir para o choque séptico. Portanto, a inibição da expressão e/ou atividade da iNOS representa um importante efeito. Nos casos dos polissacarídeos testados para produção de NO, a linhagem RAW 264.7 teve maior resposta, com média de produção de 2 mM NO^{2-} para os PNAs da cultivar Nanicão e de 1 mM NO^{2-} para os PNAs da cultivar Thap Maeo. Nas células THP-1

sem diferenciação e diferenciadas em macrófagos, a produção de NO foi 50% inferior em relação aos macrófagos RAW 264.7 para PNAs de ambas as cultivares e sendo que os da Thap Maeo apresentaram os menores índices de produção em todos os testes realizados, mostrando que nem sempre os monócitos são os maiores produtores de NO, sendo isto dependente da linhagem celular utilizada.

A fração WSP da cultivar Thap Maeo teve a produção de IL-10 quase 50% superior à da cultivar Nanicão, enquanto que nas frações UFP esse efeito se inverteu e se manteve em níveis quase iguais aos das frações HTP. O tratamento térmico das frações polissacarídicas é necessário para que a IL-10 seja induzida de forma abundante e independente da produção das citocinas IL-1 β e IL-6, parecendo estar mais relacionadas com a presença de TNF- α .

A produção de IL-10 mostra que em resposta a um estímulo inflamatório inicial, a cascata regulatória também foi estimulada e por isso não houve exacerbação na resposta das outras citocinas inflamatórias. A ativação da produção de IL-10 está intimamente ligada a ativação da via das caspases que controla o processo apoptótico e por consequência controla a homeostase da inflamação, eliminando as células ativadas que não são mais necessárias após 72 horas de sua ativação, vide testes de viabilidade. Os resultados na indução de produção de IL-10 sugerem que polissacarídeos de baixo peso molecular e/ou com cargas negativas/neutras possam ser responsáveis pela ausência de produção de IL-10 tanto em monócitos, quanto em macrófagos oriundos de células THP-1.

A relação TNF- α /IL-10 foi inferior nas células TPM em relação às células THP-1 nas frações de ambas as cultivares. O aumento na relação TNF- α /IL-10 está associada a doenças crônicas, como diabetes, hepatocarcinoma, entre outras. Já a

diminuição dessa relação, como observado em diversas frações testadas, é indicativo de uma resposta adaptativa ao estímulo inicial. O fato dos polissacarídeos de banana induzirem uma resposta mais inflamatória em monócitos e estes se diferenciarem em macrófagos com perfil anti-inflamatório ou tolerogênico é de grande interesse para manutenção de estados crônicos inflamatórios intestinais, como a reto-colite ulcerativa e a síndrome do cólon irritável, por exemplo.

A IL-12p70 é produzida após a ativação por células apresentadoras de antígenos podendo ser produzidas por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos B. Sua principal função é ativar a produção de IFN- γ pelas células NK e pelos linfócitos T, aumentando a resposta citotóxica contra células tumorais e infectadas por vírus. Enquanto nos macrófagos TPM a produção de IL-12p70 foi praticamente ausente, os monócitos THP-1 foram estimulados por todas as frações polissacarídicas de ambas as cultivares, com valores obtidos comparáveis ao estímulo dado pelo LPS na concentração de 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, demonstrando que no processo de diferenciação do monócito em macrófago por ação do PMA, os receptores para ativação da produção desta citocina podem ter sido perdidos ou suprimidos, ou a mudança na conformação desses receptores não permite a ativação pelos mesmos polissacarídeos, ou, ainda, podem agir de forma antagônica, inibindo a produção em macrófagos e estimulando em monócitos.

Já foi demonstrado que polissacarídeos de bananas e alguns BRMs estimularam a produção de citocinas por macrófagos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010), entretanto, a base molecular da via de sinalização transducional ativada por esses polissacarídeos não é completamente compreendida, principalmente devido à falta de identificação de receptores de

superfície celular específicos. Estudos mostram que receptores celulares ativados de forma não-específica pelos polissacarídeos pertencem, em geral, a classe dos Toll like, principalmente TLR-2 e TLR-4.

Nos ensaios para detecção dos marcadores de diferenciação na superfície das células THP-1 utilizando anticorpos monoclonais, o estímulo das células com 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de LPS e 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ da fração UFP Nanicão mostraram uma diminuição na expressão dos marcadores TLR-2, TLR-4, CD11c, CD33 e CD123, enquanto houve ganho nos marcadores CD14 quando comparados com as células sem tratamento. A diminuição do TLR-4 pode ser devido à competição com o ligante ao receptor TLR-4 ou ainda redução na expressão do receptor para controle da resposta inflamatória em um processo tolerogênico ao ligante, da mesma maneira com os receptores TLR-2. Apesar de normalmente receptores TLR-2 apresentarem expressão diminuída durante o processo de diferenciação (DAIGNEAULT et al., 2010), eles podem ter sido alvo dos polissacarídeos de banana, ricos em mananos e que possuem alta afinidade por estes receptores.

O CD14 é um dos marcadores mais expressos em monócitos e em menor quantidade em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas e associado com a diminuição de CD11c e CD123, podemos supor que o LPS levou as células THP-1 a assumirem um fenótipo transitório, com características que apontam um início de diferenciação em direção aos monócitos.

Os polissacarídeos isolados demonstraram capacidade de promover estímulo de diferenciação nas células THP-1. Apesar de não apresentarem aderência ou aumento na complexidade, quando comparadas ao controle negativo as células THP-1 mostraram uma grande mudança na expressão dos marcadores

testados, fato que pode ser observado nas células tratadas com GM-CSF, nas quais houve aumento de todos os marcadores testados.

O GM-CSF estimula as células tronco a produzir granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e monócitos. Os monócitos deixam a circulação e migram para o tecido, onde eles finalmente amadurecem em macrófagos e células dendríticas. Desse modo, GM-CSF faz parte da cascata imune inflamatória, pois ativação de um pequeno número de macrófagos pode levar a um rápido aumento em seu número, em um processo crucial para combater a infecção. O aumento pronunciado dos marcadores, principalmente do CD14, é indicativo que as células THP-1 entram em diferenciação em monócitos, porém, ainda com a plasticidade de se direcionarem para outros subtipos como macrófagos e células dendríticas.

Nas frações WSP das cultivares Nanicão e Thap Maeo não houve diferença estatística entre TLR-4 e CD14 e houve perda dos outros marcadores o que denota que a célula entrou em processo de diferenciação, principalmente pela perda de receptores TLR-2, CD123 e CD33, ainda sem fenótipo definido, mas com tendências de diferenciação em monócitos ou macrófagos. Nas frações UFP da cultivar Thap Maeo e nas frações HTP de ambas as cultivares houve perda significativa dos marcadores TLR-2, CD11c, CD123, CD33 e ganho nos marcadores CD14 enquanto o marcador TLR-4 permaneceu inalterado, mostrando que a ativação das células THP-1 pelos polissacarídeos solúveis não-amido de banana não só desencadeou a produção de citocinas, NO e inibição ou ativação da fagocitose, bem como participaram ativamente do processo de diferenciação celular. Seja pela perda dos marcadores de monócitos e células dendríticas seja ou aumento do CD14, ambos os eventos levaram à diferenciação em direção à série

granulocítica e, provavelmente, a ativação de proteínas quinases C está envolvida nesse mecanismo (DAIGNEAULT et al., 2010).

Aliado ao fato da alta produção de IL-8, que aumenta a migração de monócitos para o sítio de ação desses polissacarídeos, podemos observar que além do recrutamento, esses polissacarídeos promovem a diferenciação das células THP-1 em monócitos similares aos derivados de monócitos periféricos. Porém, esse efeito provavelmente está em sinergismo com a produção de citocinas, como, por exemplo o TNF- α , visto que não há um padrão de produção destas, mesmo com fenótipos similares (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014; DAIGNEAULT et al., 2010; KANWAR; KANWAR, 2009; PARK et al., 2007).

Outro fato que revela a diferenciação das células THP-1 é o aumento em seu tamanho e/ou complexidade, demonstrado pelos resultados em que todas as frações polissacarídicas, sem exceção, foram capazes de promover aumento do tamanho das células THP-1. Isso aliado à mudança nos marcadores já discutidas acima, mostra claramente que esses polissacarídeos possuem efeito, direto ou não, sobre os mecanismos de diferenciação da série granulocítica. Fato curioso foi observado para as células THP-1 tratadas apenas com LPS, que promoveram a diminuição do volume celular em relação ao controle negativo, o que pode denotar início de apoptose ou, ainda, não ter desencadeado o processo de diferenciação por aumento de tamanho, mas sim pelo aumento do CD14 aliado a perda de TLR-2 e outros marcadores imaturos nas primeiras 24h.

Os TLRs são uma família de proteínas que desempenham um papel fundamental no reconhecimento de patógenos invasores e ativação da produção de citocinas pelos macrófagos (ANDO et al., 2002). A baixa expressão dos

receptores TLR nas células do lúmen intestinal em contraste com a alta expressão nas células do lado baso-lateral existe para evitar reações exacerbadas que possam ocorrer através da dieta. Ao mesmo tempo, esse mecanismo é eficaz, pois se algum componente romper a barreira de mucosas, o lado baso-lateral possui uma carga de receptores de reconhecimento muito superior e capaz de induzir a inflamação de forma imediata. Similarmente, a hipoatividade dos TLRs pode resultar em grande susceptibilidade aos patógenos (ABREU, 2010). Além disso, variações genéticas entre indivíduos produzem pleomorfismos nos TLRs e, portanto, podem haver diferenças nas respostas ocasionadas por BRMs de indivíduo para indivíduo, sendo um grande complicador para o estudo *in vivo* dessas substâncias imunomoduladoras (NEU, J; WALKER, 2011).

A diminuição do marcador TLR-2 demonstra que a célula está entrando em estado de diferenciação (DAIGNEAULT et al., 2010) e foi possível observar uma discreta perda na capacidade proliferativa (dados não apresentados), porém sem mostrar adesão celular. Suspeita-se que assim como o LPS, os polissacarídeos de banana se liguem aos receptores TLR-4, visto que as diferenças nos padrões de citocinas expresso quando as células são expostas a ambos são praticamente os mesmos. Entretanto, tais diferenças não impedem que eles estejam reagindo com outros tipos de receptores da superfície celular como dectina-1, receptores de manose, o próprio TLR-2 entre outros conforme discutido acima, como no caso dos mananos presentes nas frações isoladas de banana.

As complexas interações entre antígenos (patógenos, alimentos, microbiota, etc.) com os receptores das células do sistema imune, focado no de mucosas do intestino (GALT), é um dos primeiros passos para compreendermos melhor as relações não-nutricionais entre alimentos e sistema imune. Portanto, existem

fatores diversos que podem influenciar a substância desde o momento da entrada no organismo, como a presença de enzimas na saliva, sucos gástricos e biliares, os movimentos físicos do sistema digestório, a presença de microbiota diversa, produção de defensinas, camada de muco, acidez gástrica, entre outros (VINDIGNI et al., 2016). São centenas de variáveis muito complexas para serem controladas e reproduzidas *in vitro*. Mesmo que os polissacarídeos não consigam atingir as células alvo como ocorre *in vitro*, estes serão provavelmente fermentados no cólon pelas bactérias anaeróbias e os produtos resultantes serão ácidos graxos de cadeia curta, que da mesma maneira, exercem efeito potente sobre o sistema imune e a própria microbiota como, por exemplo, o butirato que promove a criação e fortalecimento das *tight junctions* entre os enterócitos, e o acetato, que inibe o processo apoptótico de células do sistema imune como macrófagos e monócitos.

Em geral, mediadores pró-inflamatórios como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e prostaglandina E-2 são essenciais para a sobrevivência do indivíduo sinalizando respostas que irão protegê-lo de células e tecidos danificados ou com anormalidades. Essas citocinas podem ser produzidas pela estimulação de células do sistema imune, incluindo linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Entretanto, a secreção excessiva de citocinas pró- inflamatórias pela ativação descontrolada de células imunes pode produzir efeitos danosos no processo de reparo de células e tecidos danificados, agravando o local com uma inflamação severa. Por isso, citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 , também precisam ser liberadas para prevenir dos efeitos deletérios da cascata inflamatória resultante da ativação excessiva dos macrófagos, além do processo apoptótico que ocorre após a resolução do processo inflamatório (KIM et al., 2011).

A diversidade da microbiota interindividual é um fator que dificulta o estudo *in vivo* de forma eficaz, pois há inúmeros fatores de interferência que atuam concomitantemente, prejudicando a análise de resultados que muitas vezes mostram ampla variância dentro de uma mesma população, mesmo sendo isogênica. Portanto, a elucidação dos mecanismos de ação dos polissacarídeos BRMs é essencial para compreender como essas interações ocorrem *in vivo*. A determinação da estrutura e as interações com os receptores imunes, além das interações com a microbiota do hospedeiro, são pontos-chave que necessitam de melhor elucidação. A maioria dos estudos consultados nessa tese não evolui neste ponto, demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados em relação às funções não-nutricionais dos alimentos e suas interações com o sistema imune, principalmente o de mucosas.

6. CONCLUSÃO

Os polissacarídeos não-amido solúveis em água de ambas as cultivares de bananas, pertencentes às classes de homogalacturonanos, mananos e arabinogalactanos, foram capazes de estimular a proliferação de macrófagos murinos e humanos, ativando a cascata imunológica com a produção de citocinas TNF- α e IL-6, principalmente em macrófagos RAW 264.7, e IL-8 nas células THP-1 com diferenças estatísticas significantes entre os resultados das cultivares.

Além de aumentar a capacidade fagocítica de ambas as linhagens de macrófagos, tanto a murina RAW 264.7 quanto a humana derivada de células THP-1 diferenciadas por PMA quando testadas *in vitro*, as subfrações de maior peso molecular tiveram maior impacto na ativação destas, porém, com perfis similares na expressão dos marcadores de superfície celular testados como CD14, CD33, CD123, CD11c, TLR-2 e TLR-4. Quando testados nas células da linhagem HL-60, os polissacarídeos de banana de ambas as cultivares mostraram efeito citotóxico intenso.

Houve diferença significativa entre as linhagens celulares quando estudadas sob as mesmas condições e utilizando as mesmas frações polissacarídicas demonstrando que cada tipo celular responde ao estímulo polissacarídico de forma independente da espécie e do tipo celular em estudo, e, principalmente, seu nível de diferenciação quando esta linhagem for pluripotente, como observado nas diferenças entre os macrófagos da linhagem murina e humana e entre os monócitos e macrófagos oriundos da mesma linhagem (THP-1).

O cultivo celular mostrou ser uma ferramenta útil, de baixo custo, fácil reprodução e com resultados significativos para a triagem de polissacarídeos imunomoduladores em alimentos, permitindo uma prévia seleção de moléculas imunologicamente ativas que justifique seu estudo posterior *in vivo*, com a vantagem de apresentar resultados em pouco tempo e a possibilidade de realizar diversos experimentos com replicatas técnicas e biológicas, independente de outros interferentes que possam ser encontrados em estudos *in vivo*, como, por exemplo, a microbiota intestinal. Porém, antes da transposição destes resultados e eventual reprodução dos mesmos em sistemas *in vivo*, é necessária a elucidação dos mecanismos pelos quais esses polissacarídeos atuam nas células imunes.

7. BIBLIOGRAFIA

- ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 131–144, 2010.
- AKRAMIENE, D. et al. Effects of beta-glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, v. 43, n. 8, p. 597–606, 2007.
- ALBERS, R. et al. Monitoring immune modulation by nutrition in the general population: identifying and substantiating effects on human health. **The British journal of nutrition**, v. 110 Suppl, p. S1-30, ago. 2013.
- ANDO, I. et al. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF-kappa B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. **Int Immunopharmacol**, v. 2, n. 8, p. 1155–1162, 2002.
- BAE, I. Y. et al. Correlation of branching structure of mushroom β -glucan with its physiological activities. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 195–200, abr. 2013.
- BOH, B. Ganoderma lucidum: A Potential for Biotechnological Production of Anti-Cancer and Immunomodulatory Drugs. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 8, n. 3, p. 255–287, 1 jun. 2013.
- BROWN, G. D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 1, p. 33–43, jan. 2006.
- BRYAN, N. B. et al. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 1, p. 23, 2010.
- CAO, L. et al. Antitumor and immunomodulatory activity of arabinoxylans: a major constituent of wheat bran. **Int J Biol Macromol**, v. 48, n. 1, p. 160–164, 1 jan. 2011.
- CHAN, G. C.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **J Hematol Oncol**, v. 2, p. 25, 2009.
- CHANDRASHEKAR, P. M.; PRASHANTH, K. V. H.; VENKATESH, Y. P. Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract. **Phytochemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 255–64, fev. 2011.
- CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHES, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 37–45, 2014.
- CHEN, J. R. et al. Immunomodulatory activity in vitro and in vivo of polysaccharide from *Potentilla anserina*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1117–1124, 2010.
- CHIHARA, G. et al. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an Edible Mushroom). **Cancer Research**, v. 30, n. 11, p. 2776 LP-2781, 1 nov. 1970.
- CHIRIGOS, M. A. Immunomodulators: current and future development and application. **Thymus**, v. 19 Suppl 1, p. S7-20, 1992.

- CORDENUNSI, B. R.; SHIGA, T. M.; LAJOLO, F. Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicao). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 26–31, jan. 2008.
- DAIGNEAULT, M. et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8668, 2010.
- DOMER, J. E.; GARNER, R. E.; BEFIDI-MENGUE, R. N. Mannan as an antigen in cell-mediated immunity (CMI) assays and as a modulator of mannan-specific CMI. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 3, p. 693–700, 1989.
- DUAN, X. et al. Modification of pectin polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 144–149, nov. 2008.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.
- ERRIDGE, C. et al. Oxidized Phospholipid Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) Signaling Is Restricted to TLR2 and TLR4: ROLES FOR CD14, LPS-BINDING PROTEIN, AND MD2 AS TARGETS FOR SPECIFICITY OF INHIBITION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24748–24759, 5 set. 2008.
- FERREIRA, S. S. et al. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 378–396, 2015.
- GUAN, J.; LI, S. P. Discrimination of polysaccharides from traditional Chinese medicines using saccharide mapping--enzymatic digestion followed by chromatographic analysis. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 3, p. 590–8, 5 fev. 2010.
- HAN, S. B. et al. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *Acanthopanax senticosus*. **International immunopharmacology**, v. 3, n. 9, p. 1301–12, set. 2003.
- HASKÓ, G. et al. Adenosine Receptor Agonists Differentially Regulate IL-10, TNF- α , and Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages and in Endotoxemic Mice. **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 4634–4640, 1996.
- HOCH, G. Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. **Functional Ecology**, v. 21, n. 5, p. 823–834, out. 2007.
- HOLDERNESS, J. et al. Polysaccharides isolated from Açai fruit induce innate immune responses. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17301, 2011.
- HWANG, J. S. et al. The polysaccharide fraction aip1 from *artemisia iwayomogi* suppresses apoptotic death of the mouse spleen cells in culture. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 4, p. 294–300, abr. 2003.
- INA, K. et al. Lentinan prolonged survival in patients with gastric cancer receiving S-1-based chemotherapy. **World journal of clinical oncology**, v. 2, n. 10, p. 339–43, 10 out. 2011.
- IWASAWA, H.; YAMAZAKI, M. Differences in biological response modifier-like activities according to the strain and maturity of bananas. **Food science and technology research**, v. 15, n. 3, p. 275–282, 2009.
- JARVIS, M.; FORSYTH, W.; DUNCAN, H. A survey of the pectic content of

nonlignified monocot cell walls. **Plant Physiology**, p. 309–314, 1988.

KANWAR, J. R.; KANWAR, R. K. Gut health immunomodulatory and anti-inflammatory functions of gut enzyme digested high protein micro-nutrient dietary supplement-Enprocal. **BMC immunology**, v. 10, n. 1, p. 7, 2009.

KARASAWA, K.; UZUHASHI, Y. A matured fruit extract of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) stimulates the cellular immune system in mice. **Journal of agricultural ...**, p. 11287–11293, 2011.

KATO, Y. et al. Structural analysis of the oligosaccharide units of xyloglucan and their effects on growth of COLO 201 human tumor cells. **International Congress Series**, v. 1223, p. 161–164, dez. 2001.

KELLY, G. S. Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. **Altern Med Rev**, v. 4, n. 2, p. 96–103, 1999.

KIM, H. S. et al. Activation of macrophages by polysaccharide isolated from *Paecilomyces cicadae* through toll-like receptor 4. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 9, p. 3190–7, set. 2012.

KIM, J.-K. et al. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International journal of biological macromolecules**, v. 49, n. 5, p. 1051–8, 1 dez. 2011.

KIYOHARA, H. et al. Different contributions of side-chains in beta-D-(1→3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunge. **Phytochemistry**, v. 71, n. 2–3, p. 280–93, fev. 2010.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 317–343, 1 jun. 2006.

LEUNG, M. Y. K. et al. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology letters**, v. 105, n. 2, p. 101–14, 15 jun. 2006.

LIAO, H. F. et al. Isolation and characterization of an active compound from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and its effect on proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. **Anti-cancer drugs**, v. 12, n. 10, p. 841–6, nov. 2001.

LIU, L. et al. Studies on immunoregulatory and anti-tumor activities of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 479–83, 30 jan. 2013.

LULL, C.; WICHES, H. J.; SVELKOU, H. F. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 2, p. 63–80, 2005.

MACMICKING, J. et al. Nitric Oxide and Macrophage Function. **Annu. Rev. Immunol**, v. 15, n. 1, p. 323–50, 1997.

MAJI, P. K. et al. Structural elucidation of a biologically active heteroglycan isolated from a hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. **Carbohydrate research**, v. 368, p. 22–8, 7 mar. 2013.

MASIH, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections.

Int J Antimicrob Agents, v. 14, n. 3, p. 181–191, 2000.

MASLEN, S. L. et al. Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 5, p. 724–35, 9 abr. 2007.

MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 1 abr. 2005.

MAXWELL, E. G. et al. Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, n. 2, p. 64–73, abr. 2012.

MIZUNO, M. et al. Contents of Anti-Tumor Polysaccharides in Certain Mushrooms and Their Immunomodulating Activities. **Food Science and Technology Research**, v. 7, n. 1, p. 31–34, 2001.

NEU, J; WALKER, W. A. Necrotizing enterocolitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 3, p. 253–63, 2011.

OOI, V.; LIU, F. A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. **International Journal of medicinal mushrooms**, 1999.

PARK, E. K. et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflammation Research**, v. 56, n. 1, p. 45–50, 2007.

PEREIRA, B. M. R. et al. Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 409–413, 2000.

PEREIRA DA SILVA, B.; PAZ PARENTE, J. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 887–893, dez. 2001.

PERES, M. C.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1. ed. [s.l: s.n.].

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

SANSONE, M. et al. The water-soluble non-starch polysaccharides from bananas display immunomodulatory properties on cultured macrophages. **Food Research International**, v. 87, p. 125–133, 2016.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2011.

SCHEPETKIN, I. A. et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 13–14, p. 1783–1799, 2005.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 3, p. 317–333, 2006.

SHEU, S.-C.; LAI, M.-H. Composition analysis and immuno-modulatory effect of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) extract. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1906–11, 15 out. 2012.

SHI, L.; FU, Y. Isolation, purification, and immunomodulatory activity in vitro of three polysaccharides from roots of *Cudrania tricuspidata*. **Acta Biochim Biophys Sin**

(Shanghai), v. 43, n. 5, p. 418–424, 2011.

SHIGA, T. M. et al. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. **J Sci Food Agric**, v. 91, n. 8, p. 1511–1516, 2011.

SHIGA, T. M. et al. Two banana cultivars differ in composition of potentially immunomodulatory mannan and arabinogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 31–41, 2017.

SILVEIRA, J. P. **Avaliação dos Efeitos Imunomoduladores e Citotóxicos de Polissacarídeos de Chorisia speciosa e Hymenaea courbaril**. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=177286>. Acesso em: 4 jan. 2015.

SIMAS-TOSIN, F. F. et al. Polysaccharides from peach pulp: structure and effects on mouse peritoneal macrophages. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2257–60, 15 out. 2012.

SINHA, B. et al. Nitric oxide downregulates tumour necrosis factor in mRNA in RAW 264.7 cells. **Research in immunology**, v. 149, n. 2, p. 139–150, 1998.

SLAVOV, A.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Immunomodulating pectic polysaccharides from waste rose petals of *Rosa damascena* Mill. **International journal of biological macromolecules**, v. 59, p. 192–200, ago. 2013.

SOARES, C. Avaliação comparativa de características estruturais do amido e enzimas relacionadas à sua degradação em cultivares de banana como padrão distinto do modelo. 2009.

SULAHIAN, T. H. et al. Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. **Respiratory research**, v. 9, n. 1, p. 59, jan. 2008.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 4, p. 523–533, 2000.

UDANI, J. K. et al. Proprietary arabinogalactan extract increases antibody response to the pneumonia vaccine: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study in healthy volunteers. **Nutr J**, v. 9, p. 32, 2010.

VINDIGNI, S. M. et al. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 9, n. 4, p. 606–625, 1 jul. 2016.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 13 mar. 2009.

WANG, H. et al. Characterization of two homogalacturonan pectins with immunomodulatory activity from green tea. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 9963–9978, 2014.

WANG, J. et al. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides derivatives. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 1, p. 33–8, 2 jan. 2013.

WENG, B. B. et al. Toxicological and immunomodulatory assessments of botryosphaeran (β -glucan) produced by *Botryosphaeria rhodina* RCYU 30101. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 4, p. 910–916, 2011.

WISMAR, R. et al. Dietary fibers as immunoregulatory compounds in health and disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1190, p. 70–85, 2010.

WISMAR, R. et al. Comparative analysis of a large panel of non-starch polysaccharides reveals structures with selective regulatory properties in dendritic cells. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, n. 3, p. 443–454, 2011.

XIE, G. et al. Fractionation and characterization of biologically-active polysaccharides from *Artemisia tripartita*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1359–1371, 2008.

XU, H. et al. Chemical composition and antitumor activity of different polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 316–322, set. 2009.

YOON, W.-J. et al. Anti-inflammatory effect of sargachromanol G isolated from *Sargassum siliquastrum* in RAW 264.7 cells. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 8, p. 1421–30, ago. 2012.

ANEXO 1 – Ficha do Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 8429722/1 - Marcelo Sansone

Email:	msansone@usp.br
Data de Nascimento:	28/01/1977
Cédula de Identidade:	RG - 26.855.134-0 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências Biológicas (Modalidade Médica) - Universidade de Mogi das Cruzes - São Paulo - Brasil - 2000

Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	21/02/2013
Início da Contagem de Prazo:	21/02/2013
Data Limite para o Depósito:	21/02/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). João Roberto Oliveira do Nascimento - 21/02/2013 até o presente. Email: jronasci@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/02/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 30/04/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 21/02/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2017

9131 - 8429722/1 - Marcelo Sansone

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5896-6/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	25/02/2013	05/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5900-2/1	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	11/06/2013	01/07/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5719-3/1	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	02/08/2013	14/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
MAE5755-6/5	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	29/11/2013	120	8	100	C	N	Concluída
EDM5791-5/11	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2013	29/11/2013	120	8	93	A	N	Concluída
FBA5756-1/1	Alergia Alimentar	16/03/2015	22/03/2015	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2017

Impresso em: 08/02/2017 11:18:31

ANEXO 2 – CURRÍCULO LATTES

2/9/2017 Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Marcelo Sansone)

Marcelo Sansone

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6117926521895493>

Última atualização do currículo em 07/02/2017

(2013-atual) Doutorado em Andamento no Departamento de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo estudando polissacarídeos isolados de banana com potencial de imunomodulação.

(2002-2013) Analista de laboratório sênior do Hospital Israelita Albert Einstein durante 10 anos com ampla experiência na área de Microbiologia, Virologia e Parasitologia Clínica, sendo coordenador e implantando o setor noturno em 2007, tornando-se o primeiro laboratório de microbiologia da América Latina a funcionar 24h.

(2007-2010) Pós-graduado em Medicina Tradicional Chinesa pelo Centro de Estudos de Acupuntura e Terapias Alternativas.

(2000-2002) Pós-graduado em Análises Clínicas e com ênfase em Microbiologia e Imunologia pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

(1996-1999) Graduação em Biomedicina pela Universidade de Mogi das Cruzes (1999).

(1992-1994) Técnico em Patologia Clínica pelo Colégio Luiza de Marillac

(Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Marcelo Sansone

Nome em citações bibliográficas

SANSONE, M.;SANSONE, MARCELO

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Bloco 14

Butantã

05508-000 São Paulo, SP Brasil

Telefone: (11) 30913647

Formação acadêmica/titulação

2013-2017 Doutorado em andamento em Faculdade de Farmácia/USP/SP Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Avaliação do efeito imunomodulador de frações polissacarídicas não-amido isoladas de banana.

Orientador: João Roberto Oliveira do Nascimento.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Palavras chave: imunomodulação; alimentos; carboidratos; macrófagos; *in vitro*.

Grande área: Ciências da Saúde

2007-2010 Especialização em Acupuntura Sistêmica. (Carga Horária: 1200h).

CENTRO DE ESTUDOS DE ACUPUNTURA E TERAPIAS ALTERNATIVAS, CEATA, Brasil.

Título Monografia: A Obesidade na Visão da Medicina Tradicional Chinesa.

Orientador: Dra. Janete S.M Valério Fernandes.

2000 -2002 Especialização em Especialização em Análises Patologia Clínica. (Carga Horária: 3600h).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título Monografia: *Chlamydia pneumoniae* como Fator de Risco para Aterosclerose.

Orientador: Dr.Maurício de Pinho Lima.

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

1996-1999 Graduação em Ciências Biológicas Modalidade Médica.

Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil.

Título Monografia: Avaliação Laboratorial da Infertilidade Conjugal.

Orientador: Prof. Marco Aurélio Tevano de Andrade.

1992 -1994 Curso técnico/profissionalizante em Patologia Clínica.

Colégio Luiza de Marillac, CLM, Brasil.

Atuação Profissional

(2013-atual) Doutorando em Ciência dos Alimentos e nutrição Experimental Faculdade de Farmácia da USP

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Participando do Projeto de linha de Pesquisa do Prof. Dr. João Roberto Nascimento de Oliveira Avaliação do potencial imunomodulador de polissacarídeos isolados de frutos e cogumelos comestíveis. Descrição: Polissacarídeos não-amido (PNAs) originados de certas plantas e fungos comestíveis podem modular a função imune, contribuindo para a manutenção da saúde. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Doutorado (2). Integrantes: João Roberto Oliveira do Nascimento Coordenador / Beatriz Rosana Cordenunsi Integrante / João Paulo Fabi Integrante / Carmen Cecília Tadini Integrante / Patricia Gama Integrante / Marcelo Sansone Integrante / Victor Costa Castro Alves Integrante. Financiador(es): (FAPESP) Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

(2002-2013) Hospital Israelita Albert Einstein, HIAE, Brasil.

Vínculo: Empregado, Enquadramento Funcional: Analista de Laboratório Sênior, Carga horária: 44

Microbiologia Clínica, Imunologia Clínica, Parasitologia Clínica. Identificação de patógenos. Mecanismos de resistência à antimicrobianos.

Responsável pelo período noturno do Laboratório de Clínico de Microbiologia e Virologia do Hospital Israelita Albert Einstein.

(2001-2007) Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual, IAMSPE, Brasil.

Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Técnico de Anatomia Patológica, Carga horária: 20

(1999 -2000) Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SCM/SP, Brasil.

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Analista de Laboratório, Carga horária: 20

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Ciência dos Alimentos.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Microbiologia.

Idiomas

Inglês: Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol: Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SANSONE, MARCELO; SANSONE, ANA CLÁUDIA MIRANDA BRITO ; SHIGA, TANIA MISUZU ; NASCIMENTO, JOÃO ROBERTO OLIVEIRA DO . The watersoluble nonstarch polysaccharides from bananas display immunomodulatory properties on cultured macrophages. Food Research International , v. 87, p. 125133, 2016.
2. SANSONE, ANA CLAUDIA MIRANDA BRITO ; SANSONE, MARCELO ; DOS SANTOS DIAS, CARLOS TADEU ; OLIVEIRA DO NASCIMENTO, JOÃO ROBERTO . Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of Tcell populations in mice. International Journal of Biological Macromolecules , v. 89, p. 1924, 2016.
3. CASTROALVES, VICTOR COSTA ; SANSONE, MARCELO ; SANSONE, ANA BRITO ; DO NASCIMENTO, JOÃO ROBERTO OLIVEIRA . Corrigendum to Polysaccharides from raw and cooked chayote modulate macrophage function [Food Res. Int. 81 (March 2016), 171179]. Food Research International , v. 82, p. 172, 2016.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. SANSONE, A. C. M. B. ; SANSONE, M. ; Viviani Giampaoli ; NASCIMENTO, J. R. O. . Oral administration of banana fruit lectin modulates immune system of mice. In: 3rd International Conference on Food Digestion, 2014, Wageningen. 3rd International Conference on Food Digestion, 2014.

Apresentações de Trabalho

1. SANSONE, M.; GUIMARAES, M. ; FUJII, C. M. ; SIQUEIRA, I. ; MARTINO, M. D. V. Automação versus amicacina: o problema é real? 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. SIQUEIRA, I. ; SANSONE, M. ; OLIVEIRA, D. ; FORNABAIO, T. ; MARTINO, M. D. V. Detecção de cepas de *Staphylococcus* spp à oxacilina. Ainda justifica-se o uso da automação? 2009.(Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. MARTINO, M. D. V. ; SANSONE, M. ; GUGEL, J. ; GUIMARAES, M. ; SIQUEIRA, I. DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENENS EM CEPAS DE ENTEROBACTÉRIAS. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. MARTINO, M. D. V. ; SANSONE, M. ; GUIMARAES, M. ; GUGEL, J. ; SIQUEIRA, I. Detecção de Resistência aos Carbapenems em Cepas de *Klebsiella pneumoniae*. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. MARTINO, M. D. V. ; CARRARO, E. ; PEROSA, A. H. ; SIQUEIRA, I. ; SANSONE, M. ; PASTERNAK, J. Frequência de positividade da identificação de vírus respiratório sincicial em amostras clínicas. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. MARTINO, M. D. V. ; ROQUETTE, F. ; SIQUEIRA, I. ; SANSONE, M. ; GUIMARAES, M. ; PASTERNAK, J. O uso da automação na detecção e identificação do *Vibrio vulnificus*. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. BELARMINO, K. ; MARTINO, M. D. V. ; PASTERNAK, J. ; SIQUEIRA, I. ; MIRAGLIA, R. ; SANSONE, M. ; PEROSA, A. H. Diagnóstico das bacteremias através da hemocultura automatizada. 2005.(Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. PLANELIS, M. D. ; PASTERNAK, J. ; MARTINO, M. D. V. ; SIQUEIRA, I. ; REIS, A. R. ; SANSONE, M. ; GUGEL, J. Detecção de diferentes espécies de micobactérias através da automação. 2005.(Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. ALMEIDA, L. R. ; MARTINO, M. D. V. ; SIQUEIRA, I. ; OLIVEIRA, D. ; SANSONE, M. ; PASTERNAK, J. ; GUIMARAES, M. Aspectos microbiológicos das infecções em pacientes imunodeprimidos.2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. SANSONE, M. ; SIQUEIRA, I. ; OLIVEIRA, D. ; PLANELIS, M. D. ; MARTINO, M. D. V. ; PASTERNAK, J. ; FAULHABER, M. H. W. *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*: identificação e determinação do perfil de sensibilidade em amostras do trato genital. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. PLANELIS, M. D. ; REIS, A. R. ; SANSONE, M. ; PEROSA, A. H. ; MARTINO, M. D. V. ; FAULHABER, M. H. W. Isolamento de bactérias anaeróbias em amostras clínicas. 2004. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. PLANELIS, M. D. ; MARTINO, M. D. V. ; SANSONE, M. ; PASTERNAK, J. ; MAGALHAES, V. D. ; AZEVEDO, F. P. M. ; FAULHABER, M. H. W. Identificação de micobactérias patogênicas e oportunistas combinando método radiométrico, laminocultivo e biologia molecular. 2003. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
13. CORTEZ, D. A. ; MARTINO, M. D. V. ; SIQUEIRA, I. ; SANSONE, M. ; PLANELIS, M. D. ; SANTOS, B. C. ; PASTERNAK, J. ; FAULHABER, M. H. W. Cateter vascular: Metodologia semiquantitativa e quantitativa. 2003. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
14. ALMEIDA, G.M.D. ; PADILHA, A.R. ; MOTTA, A. L. ; SANSONE, M. ; SALES, T. C. ; TAVELIN,W; FREITAS, S. A. R. T. ; BENTO, C. N. ; ROSSI, F. Endocardite infecciosa relacionada a infecção de marcapasso por *Brucella* sp. Relato de caso. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
15. SALES, T. C. ; ARRUDA, R. S. ; ALMEIDA, G.M.D. ; PINTO, M.I.C. ; MOTTA, A. L. ; CURY, A. P. ; SANSONE, M. ; SILVA, M.R. ; ROSSI, F. Positividade da Pesquisa e Cultura de Micobactérias em diferentes materiais clínicos. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
16. SANSONE, M.; ROSSI, F. ANÁLISE DE POSITIVIDADE PARA BACTÉRIAS DE 11.358 HEMOCULTURAS ENCAMINHADAS A SEÇÃO DE MICROBIOLOGIA DA DLC-HC-FMUSP NO PERÍODO DE JANEIRO DE 1998 À JULHO DE 2000. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
17. CASTILHO, V. L. P. ; GONCALVES, M.N. ; SANSONE, M. ; MOTTA, A. L. ; CURY, A. P. ; SALES, T. C. ; LIMA, M. P. ; BURATINI, M. N. Blastocystis hominis: Diagnóstico Laboratorial pela Coloração de Leishman. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
18. MOTTA, A. L. ; CURY, A. P. ; SANSONE, M. ; SALES, T. C. ; ALVES, S. M. M. ; TAVELIN,W. ; MIMICA, S. M. J. ; RODRIGUES, H. M. P. ; PINTO, M.I.C. ; ALMEIDA, G.M.D. ; LIMA, M. P. ; ROSSI, F. Descrição de Isolados de Estreptococos do Grupo Viridans com Resistência Intermediária e Resistência de Alto Nível à Penicilina. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
19. MANGUEIRA, C. L. P. ; CURY, A. P. ; MOTTA, A. L. ; SALES, T. C. ; SANSONE, M. ; LIMA, M. P. ; KINSKOWSKI, F. ; VALIM, M. G. L. Pesquisa de Anticorpos AntiDnase B por um Novo Teste Nefelométrico no Diagnóstico de Infecções Estreptocócicas: Correlação com os Títulos de Anti-Estreptolisina O (ASLO) e Idade de Acometimento. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
20. LIMA, M. P. ; PEREIRA, J. C. R. ; SALVARANI, N. A. C. ; SALES, T. C. ; SANSONE, M. ; MOTTA, A. L. ; CURY, A. P. ; ALMEIDA, G.M.D. ; ROSSI, F. ; BURATINI, M. N. Anticorpos anti-*Chlamydomphila pneumoniae* como Fator de Risco para Doença Coronariana. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
21. LIMA, M. P. ; PEREIRA, J. C. R. ; SALVARANI, N. A. C. ; SALES, T. C. ; SANSONE, M. ; MOTTA, A. L. ; CURY, A. P. ; ALMEIDA, G.M.D. ; PERINI, A. M. ; ROSSI, F. ; BURATINI, M. N. Níveis Plasmáticos de Fibrinogênio como Preditor de Doença Cardiovascular.. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
22. LIMA, M. P. ; ALMEIDA, G.M.D. ; SICILIANO, R. F. ; FREITAS, S. A. R. T. ; CURY, A. P. ; MOTTA, A. L. ; SANSONE, M. ; SALES, T. C. ; ROSSI, F. ; MEDEIROS, E. B. Infecção Pulmonar por *R.equi* em Pacientes com AIDS.. 2001. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 4th Meeting of International Cytokines & Interferon Society. San Francisco 2016.
2. Curso de cultivo e manejo ZebraFish 2015. (Oficina).
3. Divulgando as Especialidades da Biomedicina Acupuntura:Acupuntura como especialidade na Biomedicina 2015. (Simpósio).
4. 3rd International Conference on Food Digestion COST-INF OGEST Wageningen, Holanda 2014.