

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

Avaliação in vitro e in vivo do potencial imunomodulador de frações polissacarídicas
extraídas do chuchu

Mayra Crystiane de Aragão Batista

Tese para obtenção do grau de DOUTORA
Orientador: Prof. Tit. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo-SP
2021

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

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial imunomodulador de frações polissacarídicas
extraídas do chuchu

Mayra Crystiane de Aragão Batista

Versão corrigida da tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do grau de DOUTORA
Orientador: Prof. Tit. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo-SP
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B333a Batista, Mayra Crystiane de Aragão
Avaliação in vitro e in vivo do potencial
imunomodulador de frações polissacarídicas extraídas
do chuchu / Mayra Crystiane de Aragão Batista. -
São Paulo, 2021.
96 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental -
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.
Orientador: Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Chuchu. 2. Polissacarídeos. 3. Monossacarídeos.
4. Sistema imune. 5. Cultura de células. I. T. II.
Nascimento, João Roberto Oliveira do , orientador.

Mayra Crystiane de Aragão Batista

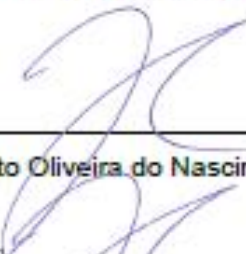
Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial imunomodulador de frações
polissacarídicas extraídas do chuchu

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do título de DOUTORA

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



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



Profa. Dra. Patricia Gama – ICB/USP



Dr. Victor Costa Castro Alves – School of Science and Technology, Örebro
University



Prof. Dr. João Paulo Fabi – FCF/USP

São Paulo, 28 de Junho de 2021.

Dedico este trabalho, aos meus maiores incentivadores e exemplos de superação: meus pais AIRTO e ALEIDE, meus irmãos MARCELO e MARCUS e meu querido tio MANOEL HORA (*in memoriam*), como retribuição ao amor, apoio incondicional e eterna amizade. Sempre me mostrando que o estudo é nossa maior conquista e mérito pessoal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado condições de chegar até aqui, sempre me guiando, me protegendo, me dando força para levantar e seguir lutando mesmo quando eu achava que não conseguia mais.

Ao meu orientador, Prof. Tit. João Roberto Oliveira do Nascimento, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, confiança, paciência, amizade e apoio quando mais precisei. Serei sempre grata.

À Profa. Tit. Beatriz Rosana Cordenunsi Lysenko, por gentilmente abrir a porta de seu espaço de trabalho, por acreditar em mim e pelo carinho que criamos uma pela outra.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, por todo o aprendizado e auxílio no desenvolvimento da minha pesquisa, em especial ao Prof. Dr. João Paulo Fabi, Prof. Dr. Eduardo Purgatto e Profa. Dra. Neuza Hassimotto pela amizade, pelos momentos compartilhados na copa e pela troca de conhecimento.

Às técnicas do laboratório Lúcia, Luciene, Aline e Tânia, por sempre estarem dispostas a compartilhar conhecimento técnico-científico e ajudar nos experimentos. Um agradecimento especial à amiga Dra. Tânia Shiga, por se desdobrar em me ajudar com a análise de ligação, mas acima de tudo pelo carinho e amizade que criamos.

À Dra. Roberta Ghedini por ser uma grande parceira no desenvolvimento do meu primeiro projeto com goiaba. Obrigada pelo esforço para que tudo caminhasse bem, por me ensinar tanto e por todo carinho comigo.

Ao Dr. Victor Costa Castro-Alves pela amizade, pela grande ajuda e contribuição no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por você e Samira sempre serem um braço amigo dentro e fora do laboratório.

À amiga Dra. Ana Cláudia Miranda Brito Sansone e à técnica do laboratório Luciene Fagundes Lauer Macedo que foram fundamentais no desenvolvimento do experimento *in vivo*. Obrigada pela paciência e ajuda com os camundongos, pela troca de conhecimento e pela amizade.

À toda equipe do Biotério de Produção e Experimentação da FCF e do IQ da USP. Em especial à Flávia Ong pelo suporte e pela troca de conhecimento durante a execução do experimento *in vivo*.

Ao laboratório de Lípidos, em especial à amiga Dra. Luciana Tedesco por gentilmente liberar o uso de equipamentos utilizados nos experimentos e pelo carinho.

Ao Food Research Center – FoRC pelo auxílio financeiro e à Claudia Denani e Isabel Bossi pela ajuda em resolver coisas burocráticas.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, em especial à Lurdinha, Edilson, Roberta e Vanessa pelo suporte e carinho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade em poder desenvolver o doutorado.

À CAPES pela concessão de bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP pelo auxílio financeiro #2013/07914-8, concedido ao Centro de Pesquisas em Alimentos / Food Research Center – FoRC, no âmbito do qual o presente trabalho foi desenvolvido.

Aos membros da banca do exame de qualificação, por toda colaboração com as considerações para que o trabalho se desenvolvesse bem.

Aos meus pais, Airto e Aleide, pelo amor incondicional, minha base inabalável, meus exemplos de vida, sempre dedicando suas vidas em prol da minha felicidade, do meu sucesso, e bem-estar, e mesmo de longe eles conseguiam se fazer presentes a todo momento, mostrando o quanto são orgulhosos da minha caminhada.

Aos meus irmãos-amigos, Marcelo e Marcus, e às minhas cunhadas-irmãs, Vanessa e Thaisa, pela amizade, incentivo, conselhos, carinho, sempre me dando força e me auxiliando em todos os momentos.

Às minhas sobrinhas-afilhadas, Melissa e Nicole, meus maiores exemplos de superação, minhas guerreirinhas, sempre me acalmando com seus sorrisos, deixando os meus dias mais leves.

Às minhas famílias, Aragão e Batista, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim. Frances, Tâmis, Évylla e Karla, primas-irmãs, uma sempre na torcida da outra, mostrando que nossa ligação e amor vão além da distância. Às minhas tias Margarete, Angélica, Rosângela, Elce e Maria José por estarem ao meu lado nessa caminhada, cuidando de mim com muito carinho. Em especial, ao meu querido tio Manoel Hora (*in memoriam*) exemplo de generosidade, de caráter, sempre vibrou e esteve presente nas

minhas conquistas. Nesse momento não seria diferente, tínhamos planos. Sua presença é e será sentida para sempre em meu coração.

Aos meus amigos de Aracaju, Alisson, Cris, Amanda, David, Socorro, David, Bella, Tom, Luanda, Liliane, Mateus, Shirley, Yuri e Thaianne que mesmo a 2.200 km de distância não deixaram de mandar as melhores energias para que eu ficasse bem. Um especial à Bruno, Amandinha, Daniele, Edie, Thaiza, Rossian, Ana Marla, Mari, Ciro e Uellison que acompanharam esse processo do meu lado, sempre me dando força, me distraíndo, me ajudando no que podiam. Vocês deixam meu coração maisquentinho. Que bom que tenho vocês. Ingrid e Thiago, meus amigos-irmãos, juntos comigo desde a graduação, que me trouxeram pra São Paulo para que continuássemos dividindo nossos perrengues da pós-graduação, mas também dividindo uma vida como família. Feliz em alcançar mais essa conquista ao lado de vocês.

Aos amigos que São Paulo e o laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos me apresentaram. Em especial à Ellen, Janayra, Renier, Sabrina, Victor, Samira, Ana Cláudia, Raissa, Rodrigo, Laís, Jéssica, Eric, Florença, Jacque, Lucas, Layane, Felipe, Magner, Luciana, Manu, Thiecla, Aline, Lúcia, Taninha e JP obrigada por fazerem esses 5 anos mais leves, mais enriquecedores. Dividimos histórias, angústias, superações, alegrias, abraços, almoços no bandejão, bancadas de experimento... Obrigada pela amizade e carinho imensuráveis, guardarei sempre em meu coração.

A tio Carlos, tia Cleide e minha amiga Danieli, vocês fizeram e fazem eu sentir que tenho uma família em São Paulo. Obrigada por me acolher em todos os momentos.

Ao meu psicólogo Norton, por segurar em minha mão nesse final de doutorado que não foi nada fácil. Obrigada por me ajudar a fechar esse ciclo com mais tranquilidade.

E a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram a chegar até aqui... Gratidão!

“Sonhar é verbo, é seguir, é pensar, é inspirar, é fazer força, insistir, é lutar, é transpirar. São mil verbos que vêm antes do verbo realizar.”

Bráulio Bessa

RESUMO

BATISTA, M. C. A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial imunomodulador de frações polissacarídicas extraídas do chuchu.** 2021. Tese (Doutorado) – Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os polissacarídeos não amido constituem importante parcela das fibras dietéticas, e podem ser considerados modificadores de resposta biológica (MRBs), uma vez que são capazes de interagir com o sistema imune, e suas características estruturais estão atreladas aos efeitos biológicos gerados. O potencial imunomodulador dos polissacarídeos do chuchu já foi demonstrado, entretanto, informações sobre suas características estruturais e sua relação com o perfil imunológico são limitadas a ensaios *in vitro*, não havendo, até o momento, estudos *in vivo*. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o perfil imunomodulador de frações isoladas do polissacarídeo do chuchu. Por meio da filtração tangencial foram obtidas as frações de estudo, SeRI<50 e SeSE<50, respectivamente as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu extraídas do resíduo insolúvel e do sobrenadante pós-tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. A caracterização por meio da determinação da composição monossacarídica e da análise de ligação apontou que ambas as frações são formadas por galacturonanos, arabinanos, arabinogalactanos e glicomananos. A SeRI<50 é menos ramificada e, provavelmente, composta por galactanos, enquanto SeSE<50 é mais ramificada e, provavelmente, composta por galactuglucomananos. Essas frações foram capazes de estimular os macrófagos murinos RAW 264.7 e as células mononucleares do baço, do sangue e do intestino delgado de camundongos Balb/c, sugerindo um perfil de ação mais pró-inflamatório, com base nos efeitos produzidos pelas espécies reativas de oxigênio, citocinas e pelos marcadores de ativação de linfócitos. Ambas as amostras, SeRI<50 e SeSE<50, mostraram ser eficientes em ativar a cascata imunológica, não sendo citotóxicas mesmo com a maior concentração testada no ensaio *in vitro*.

Palavras-chaves: chuchu, polissacarídeo não amido, frações polissacarídicas, imunomodulação, macrófagos, linfócitos.

ABSTRACT

BATISTA, M. C. A. ***In vitro* and *in vivo* evaluation of the immunomodulatory potential of polysaccharide fractions extracted from chayote.** 2021. Thesis (Doctorate) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Non-starch polysaccharides are important components of dietary fibers, and they may be considered biological response modifiers (MRBs), as they may interact with the immune system, depending on their structural characteristics. The immunomodulatory potential of chayote polysaccharides has already been demonstrated, however, information on their structural characteristics and their relationship with the immunological profile are limited to *in vitro* assays, with no reports on *in vivo* studies. Thus, the objective of the study was to evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the immunomodulatory profile of polysaccharide from chayote. Through tangential filtration two fractions, SeRI <50 and SeSE <50, were obtained, respectively the fraction isolated from the chayote polysaccharide extracted from the insoluble residue and the fraction from the enzymatic post-treatment supernatant to remove starch, both under molecular weight 50 kDa. The monosaccharide composition and linkage analysis showed that both fractions are formed by galacturonans, arabinans, arabinogalactans and glycomanans. SeRI <50 is less branched and probably composed of galactans, while SeSE <50 is more branched and probably composed of galactuglucomannans. These fractions were able to stimulate murine macrophages RAW 264.7 and mononuclear cells of the spleen, blood and small intestine of Balb / c mice, suggesting a more proinflammatory action profile, based on the reactive oxygen species production, cytokines and lymphocyte activation markers. Both samples, SeRI <50 and SeSE <50, were able to efficiently activate the immunological cascade, not being cytotoxic even at the highest concentration tested in the *in vitro* assay.

Keywords: chayote, non-starch polysaccharide, polysaccharide fractions, immunomodulation, macrophages, lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema simplificado da obtenção das frações polissacarídicas do chuchu (*Sechium edule*), onde SeSE é a fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido e SeRI é a fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido

Figura 2- Perfil cromatográfico das frações totais do polissacarídeo do chuchu por exclusão de tamanho HPSEC-RID. (A) Perfil cromatográfico da amostra SeRI (fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido). (B) Perfil cromatográfico da amostra SeSE (fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido). No gráfico são apontados os 3 picos de pesos moleculares diferentes encontrados para cada amostra. Os números acima dos picos indicam o tempo de retenção. O eixo da abscissa equivale ao tempo de retenção (min) e o eixo da ordenada equivale ao índice de refração (nRIU – Refractive Index Unit).

Figura 3- Perfil cromatográfico por HPSEC-RID das amostras (A) SeRI<50, correspondente ao permeado da separação por fluxo tangencial com membrana de corte de 50 kDa da fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido e (B) SeSE<50, correspondente à fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido do polissacarídeo do chuchu. Nos perfis de eluição das amostras (em vermelho) estão indicados os picos correspondentes a 6 kDa e o da glicose indicando o final da separação. Os valores anotados acima dos picos indicam o tempo de retenção. Em azul é mostrado o perfil de eluição monitorado a 280 nm para a detecção de proteínas. O eixo das abscissas equivale ao tempo de retenção (min) e o eixo das ordenadas equivale ao índice de refração (nRIU – Refractive Index Unit).

Figura 4- Ensaio para a presença de endotoxinas ($\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$), por meio do teste do Lisado de Amebócitos de Límulo (LAL), em SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa, na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e em SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa, também na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O teste foi lido em espectrofotômetro a 450 nm e o cálculo para as amostras foi feito baseado na curva padrão estabelecida utilizando LPS em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 EU/mL) (lado esquerdo do eixo das abscissas).

Figura 5- Composição monossacarídica das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, determinada por cromatografia de troca iônica (HPAEC-PAD). (A) SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e (B) SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. Entre os monossacarídeos foram analisados açúcares neutros – fucose (Fuc), arabinose (Ara), ramnose (Ram), galactose (Gal), glicose (Glc), xilose (Xil) e manose (Man); e foram analisados os ácidos urônicos – ácido galacturônico (AGal) e

ácido glicurônico (AGlc). As letras sobre as barras (a, b, c) mostram a diferença estatística entre monossacarídeos da mesma amostra utilizando o teste Tuckey $p < 0,01$; e o caractere (*) mostra a diferença entre as amostras para o mesmo monossacarídeo utilizando o teste T $p < 0,01$. Letras ou caracteres iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Figura 6- Composição de monossacarídeos permetilados, não reduzidos, por ativação por carbodiimida, das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, por meio da análise de ligação. (A) SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e (B) SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. Estão apresentados apenas os monossacarídeos neutros.

Figura 7- Viabilidade celular estimada pelo ensaio com MTT de macrófagos RAW 264.7 incubados com as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu. SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. Para o cálculo do percentual da viabilidade foram considerados os valores descontados do controle branco (células tratadas apenas com meio de cultura). As amostras foram testadas em diferentes concentrações: 10, 50, 100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$, sendo o branco e a incubação com Triton X-100 usados como controles, e nos tempos de incubação de 6h, 12h, 24h e 48 horas. Letras maiúsculas (A, B, C, D, E) mostram a diferença estatística entre as concentrações em relação aos controles em cada tempo de incubação. Letras minúsculas (a, b, c) mostram a diferença estatística de uma mesma concentração em relação aos períodos de incubação. A análise estatística foi feita por meio do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Figura 8- Produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos RAW 264.7 incubados com as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, medida por meio da fluorescência relativa. SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. As amostras dos polissacarídeos foram testadas em diferentes concentrações: 10, 50, 100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$, sendo os controles negativo e positivo feitos por incubações, respectivamente, em meio de cultura apenas (branco) e meio de cultura adicionado de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), em tempos de incubação de 6h, 12h, 24h e 48 horas. Para o cálculo da fluorescência relativa foram considerados os valores descontados do controle branco. Letras maiúsculas (A, B, C, D, E, F) mostram a diferença estatística entre as incubações nas concentrações dos polissacarídeos em relação aos controles em cada tempo de incubação. Letras minúsculas (a, b, c) mostram a diferença estatística de incubações em uma mesma concentração em relação aos diferentes tempos de incubação. A análise estatística foi feita por meio do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras iguais

indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Figura 9- Ensaio de citotoxicidade das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu. A avaliação de morte celular foi feita por meio do ensaio de atividade de LDH liberada no meio de cultivo. Foram testadas as amostras: SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa, ambas nas concentrações de 50 µg/mL e 800 µg/mL. A morte celular foi expressa em porcentagem relativa ao Triton X-100 (controle). As letras sobre as colunas (a, b) mostram a diferença estatística entre os tratamentos e o controle utilizando o teste de Dunnett- $p < 0,1$. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Figura 10- Peso final dos animais utilizados no ensaio *in vivo* correspondentes aos grupos tratados com água (controle negativo – CN), tratados com a fração polissacarídica isolada extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeSE<50), tratados com a fração polissacarídica isolada extraída do resíduo insolúvel após tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeRI<50) e tratados com Pululano (controle positivo – CP). As letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias utilizando o teste de Tuckey com $p < 0,01$, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Figura 11- Citocinas produzidas por células mononucleares isoladas de amostras frescas de baço, sangue e intestino delgado de camundongos da linhagem balb/c e de células mononucleares isoladas desses tecidos e cultivadas por 24h após reestímulo. Os animais dos diferentes grupos foram tratados com: água isenta de endotoxinas (Controle Negativo – CN), fração polissacarídica isolada extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeSE<50), fração polissacarídica isolada extraída do resíduo insolúvel após tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeRI<50) e Pululano (Controle Positivo – CP). Foram analisadas a produção de IL-6, IL-10, MCP-1, INF- γ , TNF e IL-12. Barras verticais indicam desvio padrão da média. As letras (a, b, c) acima das barras indicam diferença estatística entre os tratamentos utilizando o teste de Tuckey ($p < 0,01$). Caracteres omitidos indicam que as médias não diferiram estatisticamente entre si.

Figura 12- Marcadores de ativação de linfócitos T (CD3, CD4, CD8 e CD45) e B (CD19) e de marcador de monócitos ativados (Ly6c) produzidos pelas células mononucleares do baço, sangue e intestino delgado de camundongos balb/c coletados logo após a eutanásia (células frescas) e após 24h da cultura de células primárias que sofreram reestímulo com as frações SeSE<50 ou SeRI<50. Os animais foram previamente tratados com: água isenta de endotoxinas (Controle Negativo – CN); fração polissacarídica isolada extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeSE<50); fração polissacarídica isolada extraída do resíduo insolúvel após tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeRI<50); e

Pululano (Controle Positivo – CP). Para o ensaio de reestímulo, parte das células mononucleares isoladas logo após a eutanásia (células frescas) do baço, sangue e intestino delgado de camundongos balb/c foram mantidas em cultura primária por 24h na presença dos controles, CN e CP e das frações polissacarídicas isoladas SeSE<50 e SeRI<50. Os resultados foram apresentados em forma de porcentagem. As letras (a, b) indicam diferença estatística entre os tratamentos de cada amostra de células nos diferentes tecidos para cada marcador, utilizando o teste de Tuckey ($p < 0,01$), sendo que apenas para o Ly6c de 24h foi $p < 0,1$. Caracteres omitidos indicam que as médias não diferiram estatisticamente entre si. Barras verticais indicam desvio padrão da média.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição nutricional do chuchu cru (USDA, 2020)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(O₂)– superóxido

(OH) – hidroxilas

°C – graus Celsius

µg – micrograma

AGal – ácido galacturônico

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta

AGlc – ácido glicurônico

Ara – arabinose

ATCC – American Type Culture Collection

BCA – ácido bicinconínico (Bicinchoninic Acid)

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CD19 – anticorpo monoclonal

CD3 – anticorpo monoclonal

CD4 – anticorpo monoclonal

CD45 – anticorpo monoclonal

CD8 – anticorpo monoclonal

células NK – natural killers

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CMH – Complexo de Histocompatibilidade Principal

CN – Controle negativo

CO₂ – Dióxido de Carbono

CP – Controle positivo

Dha – ácido 3-deoxi-D-lixo-heptulosárico

DMEM – meio de cultura para células RAW

DMSO – Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAse – Desoxirribonuclease

DTT – Ditioneitol

EDTA-K3 -- ácido etilendiamino tetra-acético - tripotássio

EROs – espécies reativas de oxigênio

Fuc – fucose

g – grama

Gal – galactose

Galp – galactopiranosose

Glc – glicose

h – hora

H2DCFDA – 2',7'- Diclorofluoresceína diacetato

HG – Homogalacturonanas

HGPG – solução de glutamina, penicilina / estreptomicina e gentamicina

IL-1 – Interleucina-1

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

IL-13 – Interleucina-13

IL-17 – Interleucina-17

IL-2 – Interleucina-2

IL-22 – Interleucina-22

IL-26 – Interleucina-26

IL-4 – Interleucina-4

IL-5 – Interleucina-5

IL-6 – Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

INF- γ – Interferon - gama

kDa – quilodalton- unidade de massa atômica
Kdo – ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico
LAL – Lisado de Amebócitos de Límulo
LDH – Lactato desidrogenase
LPS -- Lipopolissacarídeo
Ly6c – anticorpo monoclonal
M.W – Molecular Weight
Man – manose
MCP-1 – quimiocina monocyte chemoattractant protein-1
mg – miligrama
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
min – minutos
mm -- milímetros
MRBs – Modificadores de Respostas Biológicas
MTT – corante 3- (4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NaBD₄ – boroidreto de sódio deuterado
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaOH – Hidróxido de Sódio
nm – nanômetro
NO – óxido nítrico
nRIU – Refractive Index Unit
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS – Tampão fosfato salino
PRR – Receptores de Reconhecimento Padrão
R10 – solução de RPMI com 10% de soro fetal bovino
R20 – solução de RPMI com 20% de soro fetal bovino
Ram – ramnose

RAW 264.7 – macrófagos murinos

RG-I – Ramnogalacturonanas tipo I

RG-II – Ramnogalacturonanas tipo II

RO – alcoxila

Rpm – rotações por minuto

RPMI – meio de cultura

SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel pós tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa

SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa

SFB – Soro fetal bovino

t-Ara – arabinose terminal

Tc – linfócitos T citotóxicos

TFA – ácido trifluoroacético

t-Gal – galactose terminal

t-Galp – galactopiranosose terminal

t-Glc – glicose terminal

Th – linfócitos T auxiliares

TLRs – Toll-like receptors

TNF – Fator de Necrose Tumoral

Treg – linfócitos T reguladores

Ts – linfócitos T supressores

V – volume

Xil – xilose

α – alfa

β – beta

μm – micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1. Da fibra dietética aos polissacarídeos como modificadores de respostas biológicas	26
2.2. Imunomodulação	29
2.3. Potencial efeito imunomodulador do chuchu	33
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Frutos	39
4.2. Quantificação de amido total	39
4.3. Extração dos polissacarídeos não-amido solúveis em água	40
<i>4.3.1. Extração com clorofórmio / metanol</i>	40
<i>4.3.2. Extração com etanol a quente</i>	40
<i>4.3.3. Remoção de amido e obtenção das frações polissacarídicas SeRI e SeSE</i>	40
<i>4.3.4. Inativação de enzimas e obtenção das frações polissacarídicas secas</i>	43
<i>4.3.5. Dessalinização da amostra</i>	43
4.4. Determinação da presença de proteínas	43
4.5. Tamanho molecular e homogeneidade dos polissacarídeos	44
4.6. Isolamento dos picos de diferentes pesos moleculares dos polissacarídeos	45
4.7. Detecção de endotoxinas das frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50	45
4.8. Composição de açúcares neutros e ácidos urônicos das frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50	46
4.9. Análise de ligação das frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50	47
4.10. Ensaio <i>in vitro</i> em macrófagos murinos raw 264.7 utilizando as frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50	47
<i>4.10.1. Cultivo celular das células de macrófagos murinos RAW 264.7</i>	47
<i>4.10.2. Ensaio de macrófagos murinos RAW 264.7 com SeRI<50 e SeSE<50</i>	48
<i>4.10.3. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7</i>	48

4.10.4. Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio das células de macrófagos murinos RAW 264.7	49
4.10.5. Ensaio de detecção de citotoxicidade em macrófagos murinos RAW 264.7....	49
4.11. Ensaio <i>in vivo</i> em camundongos BALB/c utilizando as frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50	50
4.11.1. Imunização em camundongos por via oral (gavagem).....	50
4.11.2. Coleta de sangue periférico, baço e intestino delgado de camundongos	51
4.11.3. Separação de células mononucleares do sangue periférico de camundongos	51
4.11.4. Separação de células mononucleares do baço de camundongos	52
4.11.5. Separação de células mononucleares do intestino delgado de camundongos	53
4.11.6. Cultura de células primárias de camundongos.....	54
4.11.7. Análise de linfócitos T e B por citometria de fluxo	55
4.11.8. Análise de citocinas por citometria de fluxo	55
4.12. Análise estatística	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Purificação dos polissacarídeos do chuchu.....	57
5.2. Identificação e isolamento das frações extraídas dos polissacarídeos do chuchu	58
5.3. Análise de endotoxinas nas frações SeRI<50 e SeSE<50	61
5.4. Análise da composição das frações SeRI<50 e SeSE<50	62
5.5. Efeito das frações SeRI<50 e SeSE<50 em macrófagos <i>in vitro</i>.....	66
5.5.1. Efeito de SeRI<50 e SeSE<50 na viabilidade celular (MTT).....	66
5.5.2. Efeito de SeRI<50 e SeSE<50 na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	69
5.5.3. Efeito das frações isoladas (SeRI<50 e SeSE<50) no ensaio de morte celular (LDH).....	72
5.6. Efeito das frações SeRI<50 e SeSE<50 em camundongos BALB/c – modelo <i>in vivo</i>.....	74
5.6.1. Peso dos camundongos de linhagem BALB/c durante o ensaio agudo de 24h .	75
5.6.2. Efeito de SeRI<50 e SeSE<50 na produção de citocinas em camundongos.....	76
5.6.3. Efeito das frações SeRI<50 e SeSE<50 na produção de marcadores de superfície celular	80
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ANEXOS	95
Anexo I – Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), autorizando o experimento em camundongos	95
Anexo II – Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), autorizando o experimento em camundongos, com alteração do prazo de autorização (prorrogação)	96

1. INTRODUÇÃO

Os legumes, as frutas e os cereais integrais, principalmente, são abundantes em fibras dietéticas, as quais são benéficas ao nosso organismo, estando relacionadas à melhora do trânsito do trato gastrointestinal, atuando na formação do bolo fecal, à redução do risco de doenças cardiovasculares, de doenças intestinais, diabetes, obesidade, câncer do cólon retal, além de conferir benefícios para o balanço da microbiota por meio da fermentação, e de agir no sistema imune (TUNGLAND; MEYER, 2002; ELLEUCH et al, 2011). As fibras dietéticas são constituídas por polissacarídeos e oligossacarídeos, sendo conhecidos como carboidratos não digeríveis. Os polissacarídeos são polímeros que estão presentes em animais, plantas e microorganismos, compostos por unidades monossacarídicas, de diferentes tipos ou não, e unidas por ligações glicosídicas, diferenciando-se quanto ao número de unidades, ao grau de ramificação, ao tipo de ligação e ao comprimento das cadeias; produzindo compostos com propriedades físico-químicas e funções biológicas particulares (LEHNINGER, 2006).

No caso das plantas, que constituem a fonte mais expressiva de fibra alimentar da dieta humana, o complexo de polissacarídeos originados da parede celular pode ser formado por celulose (cadeias de β -glucanos), hemicelulose (arabinoxilanos encontrados em cereais e xiloglucanos encontrados em frutas e vegetais), pectinas (galacturonanos presentes em frutas e vegetais), amido resistente, gomas e mucilagens (sementes e frutas) e inulina. (ELLEUCH et al, 2011; BLACKWOOD et al, 2000).

Nas últimas décadas, tem sido observado estudos reportando a atividade biológica que polissacarídeos exercem como, por exemplo, ação anti-viral, ação antioxidante, regulação do sistema imune, além de efeitos anti-tumorais, hipoglicêmicos e efeitos na redução dos lipídios (BAI et al, 2012; LI et al, 2014). Eles conseguem interagir com o sistema imunológico por meio da ativação de receptores ou por componentes desse sistema, como as quimiocinas e as citocinas, aumentando a capacidade fagocítica de células de defesa, como os macrófagos, contribuindo para o reconhecimento e destruição de patógenos mais eficientemente (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; TAN et al, 2013; YU et al, 2013).

Os macrófagos, juntamente com os neutrófilos, fazem parte da linha de defesa do organismo agindo no reconhecimento de agentes infecciosos. O uso de macrófagos em experimentos tem permitido avaliar a modulação do sistema imune, sendo responsáveis por processos inflamatórios, imunológicos e homeostáticos (ABBAS; LITCHTMAN, 2005). Além disso, tem sido reportado que polissacarídeos podem exibir funções benéficas ao modular a função imune mediada por macrófagos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006). Como por exemplo, polissacarídeos isolados do fungo *Cordyceps sinensis* podem promover as funções imunes dos macrófagos (MENG et al, 2014); e frações dos polissacarídeos do *Prunella vulgaris* exibiram forte atividade imunomoduladora, também em macrófagos, além de potencial anti-oxidante (LI et al, 2015).

A atividade biológica ou os efeitos desencadeados pelos polissacarídeos estão relacionados com as suas características estruturais, além disso, como diferentes estruturas podem interagir com diferentes receptores, essas diferenças podem influenciar nas respostas produzidas pelos macrófagos (LIU et al, 2016). Diante disso, a caracterização estrutural dos polissacarídeos é importante para entender suas características funcionais.

Em um estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando os polissacarídeos da polpa do chuchu cru, do chuchu cozido e da água do cozimento desse fruto (CASTRO-ALVES; NASCIMENTO, 2016) foi observado que os polissacarídeos obtidos modularam a função de macrófagos murinos do tipo RAW 264.7. Os polissacarídeos do chuchu cru e da água de cozimento aumentaram a viabilidade dos macrófagos quando comparados com o controle, enquanto que os polissacarídeos do chuchu cru e cozido induziram a secreção de TNF e óxido nítrico. Por outro lado, apenas os polissacarídeos do chuchu cru inibiram a secreção de citocinas e óxido nítrico em macrófagos pré-tratados com LPS e zymosan. Esses resultados demonstram que os polissacarídeos do chuchu apresentam efeitos imunomodulatórios em macrófagos do tipo RAW 264.7. Com relação às suas características de estrutura, os polissacarídeos do chuchu cru, cozido e da água de cozimento possuem composições monossacarídicas semelhantes, mas o polissacarídeo do chuchu cozido possui galactanos altamente ramificados de alto peso

molecular enquanto que o polissacarídeo da água de cozimento possui arabinanos e homogalaturonanos de baixo peso molecular. Isso mostra que mesmo pequenas mudanças na composição resultante da solubilização de polissacarídeos de baixo peso molecular durante o cozimento podem ser responsáveis por diferentes efeitos biológicos dos polissacarídeos.

Diante dos resultados promissores obtidos naquele estudo com os polissacarídeos do chuchu, e da escassez de estudos relacionando a separação e a caracterização de suas frações de diferentes pesos moleculares com o perfil imunomodulador, é interessante uma investigação mais aprofundada. Tendo em vista caracterizar essa complexa estrutura, bem como utilizar suas frações isoladas e purificadas de diferentes pesos moleculares para avaliar seu potencial biológico *in vitro*, e em cultura de macrófagos murinos, e *in vivo*, em camundongos de linhagem balb/c, que podem oferecer pistas acerca do possível efeito do consumo na dieta, haja visto que esses animais apresentam uma resposta imune similar à que ocorre em humanos. Assim, o presente estudo tem como objetivo isolar e purificar as frações de menor peso molecular do polissacarídeo do chuchu, caracterizar suas complexas estruturas e avaliá-las quanto ao seu potencial biológico *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Da fibra dietética aos polissacarídeos como modificadores de respostas biológicas

A parede celular apresenta uma estrutura complexa formada por proteínas, compostos aromáticos, como os fenólicos, e polissacarídeos, os quais constituem as fibras dietéticas (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Este último grupo é formado por polímeros contendo de 20 a centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos, neutros ou ácidos, com diferentes estruturas e composições e, como consequência, desenvolvendo diferentes funções biológicas (LEHNINGER, 2014).

A fibra dietética é geralmente conhecida como uma estrutura que não é quebrada pelas secreções digestivas do intestino humano, principalmente o intestino grosso, órgão considerado como principal área de atuação das fibras (MUDGIL; BARAK, 2013; TUNGLAND; MEYER, 2002). Contudo, ao longo dos anos o conceito de fibras tem passado por modificações e mesmo de definições, sendo algumas baseadas em métodos analíticos e outras em bases fisiológicas (SLAVIN, 2013). Uma das mais recentes definições foi publicada na Comissão do Codex Alimentarius de 2009, que destacou três pontos importantes: as autoridades nacionais se encarregariam de acrescentar ou retirar esses carboidratos não digeríveis com grau de polimerização entre 3 e 9; não haveria uma lista com os benefícios dos seus possíveis efeitos fisiológicos no organismo, mas haveriam critérios pertinentes para que fossem comprovados; e as fibras dietéticas encontradas nos alimentos precisariam passar por avaliação para serem quantificadas por meio de metodologias analíticas.

As fibras dietéticas são constituídas principalmente por polímeros como os polissacarídeos do tipo não amido, como a celulose, hemicelulose, e pectina, oligossacarídeos como a inulina, e carboidratos análogos não digeríveis, como amido resistente, dextrina, frutooligossacarídeo, galactooligossacarídeo, celulose modificada e polidextrose, bem como substâncias associadas à fibra, como a lignina, e, em minoria, saponinas, polifenóis, cera, cutina, fitatos, e fitoesteróis, que não são considerados como fibras quando sozinhos (MUDGIL; BARAK, 2013; TUNGLAND; MEYER, 2002; ELLEUCH et al, 2011).

Os polissacarídeos não amido contribui com cerca de 90% do peso seco da parede celular vegetal e são formados por celulose, a qual contribui com 20 a 40% da formação da parede celular, por hemiceluloses, contribuindo com 15 a 25% e por pectinas que contribuem com cerca de 30% da constituição da parede (FARINAS, 2011); apresentando estruturas e funções diferentes, mas que podem interagir entre si. A celulose é parte importante da estrutura de apoio da parede celular primária e secundária, no qual serve para dar suporte à planta. Ela apresenta alto peso molecular, pode ser representada por microfibrilas, formando conjuntos com elevado grau de polimerização das cadeias de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas (β -1,4 e β -1,6) (CAFFALL; MOHNEN, 2009; OCHOA-VILLARREAL et al, 2012; BRITO et al, 2008).

A hemicelulose pode ser considerada um grupo heterogêneo de polissacarídeos que apresentam peso molecular inferior ao das celulosas (OCHOA-VILLARREAL et al, 2012; SCHELLER; ULVSKOV, 2010; BRITO et al, 2008) e que está unida com a celulose por meio de ligações de hidrogênio, formando a matriz da parede celular (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Esse grupo de polissacarídeos heterogêneos é caracterizado por exibirem estruturas com composição semelhantes em suas cadeias principais, apresentando ligações glicosídicas β -(1-4), aliadas a açúcares residuais como manose, xilose, arabinose, glicose, galactose e ácido glicurônico, e mesma configuração equatorial em C1 e C4 (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; BRITO et al, 2008), podendo a hemicelulose ser classificada a partir da presença do monossacarídeo mais abundante, como, por exemplo, xilanas, arabinoxilanas, galactomananas, glicomananas, entre outras (OCHOA-VILARREAL et al, 2012; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Dentre o complexo de polissacarídeos não amido que formam a parede celular, a pectina é a mais complexa, tanto em relação à sua estrutura quanto à sua atividade biológica. Ela participa do processo de crescimento e desenvolvimento da planta (MOHNEN, 2008) e possui a capacidade de produzir géis ou soluções viscosas quando na presença da água, sendo bastante utilizada em produtos alimentícios, podendo ser empregadas como agente estabilizante em alimentos (SEYFRIED et al, 2016; MOHNEN, 2008).

Cerca de 70% da pectina é composta por unidades de ácido galacturônico (MOHNEN, 2008) e ela pode ser classificada em três grupos principais: homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas tipo I (RG-I) e ramnogalacturonanas tipo II (RG-II) (MOHNEN, 2008; KEEGSTRA, 2010). A HG é uma estrutura linear composta por ácido galacturônico que apresenta ligações α -1,4, enquanto que a RG-I e a RG-II apresentam estruturas mais complexas (MOHNEN, 2008). A RG-I é formada por uma cadeia linear de ácido galacturônico sendo intercalada com ramnose, ramificada com galactanas, arabinanas e/ou arabinogalactanas. Já a cadeia principal da RG-II é formada por uma cadeia de homogalacturonana com cadeias laterais contendo açúcares raros como apiose, ácido acérico, 2-O-metilfucose, 2-O-metilxilose, ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico (Kdo) e ácido 3-deoxi-D-lixo-heptulosárico (Dha) (MOHNEN, 2008; OCHOA-VILARREAL et al, 2012).

Apesar de ser uma matéria não digerível, as fibras dietéticas possuem várias funções, principalmente em processos metabólicos, dentre elas: melhora dos níveis de colesterol e de glicose no sangue, e conseqüentemente gerando uma melhor resposta insulínica; redução do risco de desenvolvimento de câncer, principalmente do intestino; promove barreira física e biológica contra patógenos; melhora a formação do bolo fecal e o aumento de sua viscosidade, com conseqüente influência na colonização do cólon por microorganismos benéficos por meio do processo da fermentação (TUNGLAND; MEYER, 2002; ELLEUCH et al, 2011), onde são produzidos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); além de ter influência sobre a função imunológica do organismo (KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012; SLAVIN, 2013).

Além dessa interação indireta com o sistema imune que as fibras exercem, elas também interagem de forma direta, principalmente relacionadas aos polissacarídeos extraídos da parede celular vegetal, algo muito menos investigado. Essas moléculas biologicamente ativas são consideradas Modificadores de Respostas Biológicas, MRBs, que são substâncias conhecidas por aumentar, estimular ou suprimir o sistema imune, como, por exemplo, proliferação de linfócitos e estimulação de macrófagos, monócitos, células “Natural Killer” e células dendríticas (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; LEUNG et al, 2006). Esses MRBs são também produzidos de forma endógena, como

ocorre com as citocinas e quimiocinas liberadas pelas células imunes ou produzidas por fungos e bactérias, por exemplo (LEUNG et al, 2006).

Para que ocorra essa interação direta sobre a função imunológica e estimulação entre os polissacarídeos e as células imunes, é necessário que os receptores específicos localizados na superfície celular se liguem a essas moléculas e façam a transdução de sinal. Os macrófagos e as células dendríticas são as células mais eficientes em fazer essa transdução, pois elas possuem receptores de reconhecimento padrão (PRR), facilitando a interação desses polissacarídeos MRBs com os receptores específicos (WISMAR, 2010). Esses PRRs detectam a presença de microrganismos por meio de estruturas conhecidas como PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos, que estão localizadas na superfície desses microrganismos. São exemplos de PRRs os receptores scavenger, de complemento 3 (CR3), Toll-like (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs), dectina 1 ou receptor de manose, entre outros, e a interação desses receptores com o polissacarídeo promovem a ativação de resposta imune (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; SCHEPETKIN; QUINN, 2006; GORDON, 2002).

2.2. Imunomodulação

Em condições normais o organismo está preparado para se proteger e combater patógenos, infecções, substâncias estranhas, e a isso se dá o nome de imunidade (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Quando o organismo se depara com patógenos ou com macromoléculas, como as proteínas e os polissacarídeos, por exemplo, o sistema imune é ativado e as células de defesa atuam na homeostase imunológica, no processo chamado de resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Essa resposta do organismo ocorre por meio da imunidade inata e da imunidade adaptativa, sendo a primeira a principal linha de defesa contra infecções, agindo imediatamente, cujos principais componentes são os macrófagos, monócitos, neutrófilos, granulócitos e elementos humorais (CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al, 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). No caso da imunidade adaptativa, que tem os linfócitos e seus produtos, os anticorpos, como principais elementos dessa linha de defesa, ela ocorre de forma mais tardia, e o organismo

apresenta uma resposta mais eficaz a cada vez que se expõe ao patógeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os macrófagos e os linfócitos representam as principais células do sistema imune responsáveis pela defesa do organismo. Os linfócitos são produzidos na medula óssea onde podem se diferenciar em linfócitos B; ou podem se deslocar para o timo e se diferenciar em linfócitos T (FABBRI; SMART; PARDI, 2003; LEBIEN; TEDDER, 2008). Este último tipo de linfócito age na imunidade específica celular, necessitando se associar a células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e linfócitos B, as quais vão fazer reconhecimento de antígenos por meio de sua apresentação por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CMH) presentes na superfície de sua membrana celular (MOREIRA, 2014; MESQUITA et al, 2010).

Essas células T apresentam funções diversas por meio dos subtipos dos linfócitos efetores, como, por exemplo, linfócitos T auxiliares (Th), linfócitos T citotóxicos (Tc) e os linfócitos T reguladores ou supressores (Treg ou Ts). Os linfócitos auxiliares (Th) liberam mediadores químicos (citocinas) como um meio de conseguir recrutar células para auxiliar no processo inflamatório, células estas que podem ser os linfócitos B, neutrófilos e outras células T (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; MASTACHE; ABALDE, 2005). Eles são subdivididos em Th1, Th2 e Th17: o Th1 produz elevado teor de IL-2, que induz proliferação de linfócitos e produz elevado teor de INF- γ ; o Th2 produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favorecendo produção de anticorpos; e o TH17 produz IL-22, IL-26 e citocinas da família IL-17 (MESQUITA et al, 2010).

A função dos linfócitos citotóxicos (Tc) é a de fazer a identificação das células infectadas por patógenos mediante apresentação de antígenos, liberando substâncias tóxicas para destruí-las. Eles induzem a via de morte celular programada (apoptose) na célula alvo. No caso dos linfócitos T reguladores ou supressores (Treg ou Ts), eles têm como função produzir e liberar substâncias capazes de regular a resposta imunológica quando há a ocorrência de uma inflamação ou suprimir a função das células imunes, podendo agir também em casos em que há deficiência ou ausência desse tipo de linfócito ou de sua função, como em doenças autoimunes ou imunossuprimidas (FARIA et al, 2008).

Por outro lado, os linfócitos B agem na imunidade específica humoral, ou seja, por meio do líquido extracelular. Essas células apresentam na superfície de sua membrana receptores / imunoglobulinas específicos para determinados epítopos de antígenos e quando estes se ligam ativam os linfócitos, fazendo com que se multipliquem, dando origem a plasmócitos e células B de memória, promovendo liberação de anticorpos (MOREIRA, 2014; LEBIEN; TEDDER, 2008; MESQUITA et al, 2010).

A outra célula principal de defesa do sistema imune é o macrófago, o qual é originado na medula óssea, onde inicialmente é denominado de monócito e ao sair da medula fica circulante no sangue e pode ir para os tecidos com a finalidade de amadurecer e se diferenciar, passando a receber o nome de macrófagos (MA et al, 2003). Os macrófagos representam a maior população de células imunes na maioria dos tecidos, como os do coração, cérebro, fígado, pulmão e, possivelmente, dentro do parênquima de outros órgãos, fazendo com que esse tipo celular seja o primeiro e o principal a fazer o reconhecimento de agentes infecciosos (LEE et al, 2013; CAVAILLON, 1994, BEUTLER, 2004). Eles possuem uma alta plasticidade, fazendo com que desempenhem diversas funções como participar na homeostase, reparar tecidos, atuar na resposta imunológica, na cascata da inflamação, dentre outras funções (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

Os macrófagos participam da defesa contra patógenos, mas sua principal função é a de supervisionar e coordenar a infiltração de células como os neutrófilos. Quando ativados, os macrófagos podem desempenhar um perfil pró- ou anti-inflamatório, participando da destruição ou da regeneração de tecidos (MARTINEZ et al, 2008); por isso eles se fazem sempre presentes assim que um microrganismo invade o organismo (BEUTLER, 2004), fazendo parte de todo o processo até seu desfecho final no processo inflamatório.

Os macrófagos são os maiores responsáveis por produzir e liberar citocinas e quimiocinas e, por se fazerem presentes em vários tecidos, eles são grandes contribuintes para disseminá-las pelo organismo (CAVAILLON, 1994). As quimiocinas são citocinas que possuem a habilidade de atuarem como quimiotáticas, sendo responsáveis pela movimentação de leucócitos e de outras células inflamatórias

(ABBAS; LICHTMAN, 2003). As citocinas e as quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular e possuem a habilidade de recrutar outras células imunológicas, regulando e coordenando essa comunicação por meio dos receptores específicos presentes na superfície celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015), deixando o organismo apto para combater um processo inflamatório, podendo apresentar um perfil pró- ou anti-inflamatório. Dessa forma, como exemplo de pró-inflamatórias temos as citocinas INF- γ , TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-8; e IL-10, IL-13, IL-5, IL-4 como exemplo de citocinas anti-inflamatórias.

O organismo pode ativar o sistema imune mediante a presença de alguns constituintes dos alimentos como, por exemplo, as fibras dietéticas (HACHIMURA; TOTSUKA; HOSONO, 2018). Esses componentes alimentares são os conhecidos como Modificadores de Resposta Biológica (MRBs) a exemplo dos lipídios, proteínas e polissacarídeos, os quais podem atuar no sistema imune promovendo efeito antiviral, antibactericida (LI et al, 2004), antifúngico (STUART et al, 1997), antitumoral (LEUNG et al, 2006).

O efeito biológico desses polissacarídeos como MRBs pode estar intrinsicamente relacionado com suas características estruturais, visto que a composição das moléculas dessas estruturas podem exibir atividades biológicas diferentes, por isso é importante conhecer e caracterizar o tamanho e o peso molecular, assim como sua composição monossacarídica, características das ligações glicosídicas, conformação das cadeias e grau de ramificação (HU et al, 2013). A importância das características estruturas pode ser exemplificada pelo estudo de Pereira, Melo e Mourão (2002), pois ao avaliar a atividade anticoagulante de dois polissacarídeos, observou-se diferenças bastante significativas na atividade biológica relacionadas com diferença em suas estruturas, visto que os polissacarídeos em estudo eram galactanos sulfatados e fucanos sulfatados.

Em se tratando de efeito imunomodulador, vários estudos têm utilizado diferentes tipos de polissacarídeos para relatar sua ação. O polissacarídeo isolado da planta *Echinacea purpúrea*, que é empregada para melhorar a cicatrização de feridas, foi um dos primeiros polissacarídeos estudados por sua atividade imunomoduladora (STIMPEL et al., 1984; YAMADA et al., 1985), a qual envolve a ativação de macrófagos

levando a respostas inflamatórias e reações de defesa imunológicas. No estudo de Wu et al (2014), observou-se que houve estímulo da função dos macrófagos quando utilizado o polissacarídeo do fungo *Cordyceps sinensis*. No estudo de Yang et al (2014), foi observado que o polissacarídeo extraído da planta *Dendrobium tosaense* exibiu atividade imunomoduladora em ratos, assim como Li et al (2015) observaram que o polissacarídeo extraído da planta *Prunella vulgaris Linn* tem forte atividade imunomoduladora. Zhang e colaboradores (2017) avaliou a característica estrutural e o efeito imunomodulador, *in vivo* e *in vitro*, do polissacarídeo extraído planta *Codonopsis pilosula* e observaram que eles promoveram a proliferação de linfócitos e de citocinas pela ativação de células T.

Diante disso, vegetais e fungos podem ser interessantes fontes de polissacarídeos com atividade biológica, apresentando propriedades terapêuticas e imunomoduladoras, as quais contribuem para aumentar a capacidade de defesa do organismo em reconhecer e destruir possíveis agentes patogênicos, entretanto, ainda são escassos os estudos utilizando polissacarídeos de vegetais em ensaios *in vivo* e do chuchu.

2.3. Potencial efeito imunomodulador do chuchu

O chuchu, conhecido cientificamente como *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, formalmente publicado em 1800 e derivado da palavra espanhol Nahuatl *chayojtli* (SAADE, 1996), é bastante cultivado nas regiões tropical e subtropical (AUNG; BALL; KUSHAD, 1990), e é um importante alimento na dieta da população de várias partes do mundo, principalmente da América Latina (ORDOÑEZ et al, 2006; SAADE, 1996). É uma planta herbácea, perene, monoica, montanhista e trepadeira da família das cucurbitáceas (SAADE, 1996), é, cuja maioria de suas partes (fruto, caule, folhas e raiz tuberosa) é utilizada para o consumo humano, sendo utilizados para esse fim, principalmente, o fruto e a raiz tuberosa (AUNG; BALL; KUSHAD, 1990; ORDOÑEZ et al, 2006; SAADE, 1996).

As partes comestíveis do chuchu têm praticamente baixo teor de calorias e de açúcares solúveis, são ricas em aminoácidos e em minerais; na tabela 1 pode-se observar a composição nutricional do chuchu cru (USDA, 2020).

Tabela 1- Composição nutricional do chuchu cru (USDA, 2020)

Nutrientes	Quantidade / 100 g
Caloria	19 kcal
Lipídeo total	0,13 g
Açúcares solúveis	1,66 g
Cálcio	17 mg
Magnésio	12 mg
Potássio	125 mg
Zinco	0,74 mg
Manganês	0,189 mg
Vitamina C	7,7 mg
Riboflavina	0,029 mg
Ácido Pantotênico	0,249 mg
Folato	93 µg
Vitamina E	0,12 mg
Triptofano	0,011 g
Isoleucina	0,044 g
Lisina	0,039 g
Fenilalanina	0,047 g
Valina	0,063 g
Histidina	0,015 g
Ácido Aspártico	0,092 g
Glicina	0,041 g
Serina	0,047 g
Proteína	0,82 g
Carboidrato	4,51 g

Fibras totais	1,7 g
Ferro	0,34 mg
Fósforo	18 mg
Sódio	2 mg
Cobre	0,123 mg
Selênio	0,2 µg
Tiamina	0,025 mg
Niacina	0,47 mg
Vitamina B6	0,076 mg
Colina	9,2 mg
Vitamina K	4,1 µg
Treonina	0,04 g
Leucina	0,077 g
Metionina	0,001 g
Tirosina	0,032 g
Arginina	0,035 g
Alanina	0,051 g
Ácido Glutâmico	0,125 g
Prolina	0,044 g

O fruto do chuchu pode ser consumido cru ou cozido, em diversas preparações, além de ser usado para dar consistência em purês, patês, molhos (SAADE, 1996). Sua raiz é bastante consumida cozida em algumas regiões, pois é uma importante fonte de amido (HERNANDEZ-URIBE et al, 2011; JIMÉNEZ-HENÁNDEZ; SALAZAR-MONTOYA; RAMOS-RAMÍREZ, 2007; SHIGA et al, 2015). Assim, a raiz tuberosa do chuchu tem se destacado por ser uma boa alternativa de produção comercial de amido tanto quanto a batata (HERNANDEZ-URIBE et al, 2011; JIMÉNEZ-HENÁNDEZ; SALAZAR-MONTOYA; RAMOS-RAMÍREZ, 2007).

Além desse destaque para a grande quantidade de amido na raiz tuberosa, alguns estudos mostram que as folhas, frutos e sementes do chuchu também apresentam algumas propriedades medicinais como, por exemplo, diuréticas, anti-

hipertensiva, cardiovascular, anti-inflamatória, antibacteriana, além de favorecer a cauterização de úlceras. Um estudo utilizando o extrato metanólico das folhas do chuchu demonstrou que o mesmo apresentou boa atividade antibacteriana contra infecções envolvendo bactérias Gram-negativas (NOUMEDEM et al, 2013).

O chuchu é um alimento que também apresenta um bom potencial antioxidante, conforme relatado por Ordoñez e colaboradores (2006), que observaram que o extrato etanólico das folhas e o extrato aquoso da semente apresentaram alta atividade antioxidante, além do poder redutor e de eliminação de radicais. Esses antioxidantes podem proteger o organismo contra a formação de radicais livres, os quais lesionam as células; e os antioxidantes obtidos por meio da alimentação conseguem fazer o importante papel de agir para impossibilitar a ação desses radicais, ajudando, assim, na proteção do organismo e no retardo de doenças crônicas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Alguns estudos mostram também que o chuchu apresenta propriedade anti-hipertensiva como, por exemplo, o estudo de Fauziningtyas et al (2020) e do estudo de Lombardo-Earl et al (2014) que mostraram um efeito anti-hipertensivo ao consumir o suco do chuchu por pessoas idosas e ao avaliar o extrato hidroalcolólico da raiz tuberosa do chuchu em diferentes modelos com indução de angiotensina II, respectivamente. O estudo de Salazar-Aguilar e colaboradores (2017) demonstrou que a cultivar Perla Negra de chuchu apresentou forte poder antiproliferativo em células de câncer cervical, sendo um forte candidato a potencial agente anticâncer. Outra propriedade do chuchu é a de ser anti-inflamatório, como observado o estudo de Palanisamy e Balakrishnan (2016), por exemplo, em que o extrato metanólico e o extrato aquoso do fruto chuchu mostraram efeito anti-inflamatório na estabilização da atividade da membrana das células sanguíneas humanas tratadas.

Nos últimos anos, o chuchu vem ganhando destaque também por ser uma importante fonte de polissacarídeos, tendo relevância no conhecimento de sua estrutura e no seu uso em diversas linhas, como identificado por nosso grupo de pesquisa. Shiga e colaboradores (2015) analisaram a composição e a estrutura química dos polissacarídeos solúveis e insolúveis tanto do fruto como da raiz tuberosa do chuchu e observaram que sua estrutura é composta principalmente por galactanos

altamente ramificados e arabinanos e homogalacturonanos em pequenas quantidades. No estudo de Castro e Nascimento (2016) foi observado efeito dos polissacarídeos do chuchu cru e cozido na modulação da função dos macrófagos, denotando um perfil pró-inflamatório induzido pela secreção de NO, TNF e IL-6. O polissacarídeo do chuchu também apresentou um papel importante na regulação dos sinais de priming necessários para a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos THP-1, além de regular o efluxo lipídico, quando sob influência de cristais de colesterol (CASTRO-ALVES; SHIGA; NASCIMENTO, 2019).

Os resultados obtidos acerca desse polissacarídeo pelo nosso grupo de pesquisa foram bastante promissores, mostrando que o chuchu apresenta características estruturais compostas por moléculas que tem forte relação com o efeito imunomodulador desenvolvido por macrófagos. Além disso, esses estudos analisaram a fração total do polissacarídeo do fruto chuchu das suas diferentes partes e em condições diferentes. Apesar dessas evidências, mais estudos utilizando outras abordagens relacionando sua estrutura com o perfil imunológico, são de grande valia. Com isso, é interessante que se faça uma investigação sobre a composição de sua estrutura, principalmente em frações isoladas desse polissacarídeo que apresentam pesos moleculares diferentes, além de diferenças no processo de obtenção dessas moléculas, tendo em vista que composições diferentes da estrutura podem gerar perfil imunomodulador distinto.

Da mesma maneira, é importante avaliar essas diferentes frações com pesos moleculares distintos em ensaio utilizando macrófagos, *in vitro*, e em ensaio utilizando camundongos, *in vivo*, para melhor verificar seu possível efeito imunomodulador. Diante disso, pode-se ter como hipótese de que esses polissacarídeos do chuchu quando separados em subfrações de diferentes pesos moleculares e obtidos de forma distinta, possam gerar moléculas que também tenham atividade imunomoduladora, e assim, podendo ser utilizados na alimentação promovendo benefícios à saúde.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o perfil imunomodulador dos polissacarídeos solúveis em água extraídos do chuchu (*Sechium edule*) *in natura*.

3.2. Objetivos específicos

- Extração dos polissacarídeos solúveis do chuchu *in natura* em água e em tampão (utilizado para retirada do amido);
- Isolamento e purificação das frações de baixo peso molecular dos polissacarídeos do chuchu obtidos das frações solúveis;
- Caracterização química e estrutural das frações polissacarídicas isoladas quanto ao peso molecular, composição de monossacarídeos e suas ligações, bem como a presença de amido e proteínas;
- Avaliação do potencial efeito imunomodulador das frações polissacarídicas por meio de testes *in vitro* empregando células RAW 264.7, derivadas de macrófagos murinos;
- Avaliação do potencial efeito imunomodulador das frações polissacarídicas por meio de ensaio agudo (24h) *in vivo* em camundongos da linhagem Balb/c, utilizando a cultura celular primária dos tecidos baço, sangue e intestino delgado, mensurando os níveis de citocinas e porcentagens de linfócitos nas amostras frescas e após 24h de reindução com os polissacarídeos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Frutos

Os chuchus (*Sechium edule*) da variedade verde, classificados como “extra”, seguindo as diretrizes da FAO/WHO (1999), foram adquiridos em comércio local (São Paulo/SP – Brasil) e estavam prontos para o consumo. Foram cerca de 15 frutos, variando entre 425 e 570 gramas. Eram livres de odores não característicos, assim como de danos físicos, eram firmes, e tinham aparência de frescos.

Foram retiradas a casca e a semente, e a polpa foi cortada em cubos e congelada em nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C, até serem liofilizadas. Após a liofilização, as amostras foram trituradas em um processador doméstico até completa pulverização e, em seguida, foram armazenadas a temperatura ambiente em dessecador para análises posteriores.

4.2. Quantificação de amido total

Para essa determinação, foi utilizada o método de Bernt e Bergmeyer (1974), como descrito por Cordenunsi e Lajolo (1995). Aproximadamente 0,5 g de amostra liofilizada foi homogeneizada em 5 mL de solução 0,5M NaOH e a suspensão foi transferida para um balão de 25 mL, ao qual foram adicionados 5 mL de 0,5M Ácido Acético para neutralizar a solução. À essa mistura foi adicionada água ultrapura (sistema de purificação Milli-Q) até completar o volume final de 25 mL. Uma alíquota de 1 mL foi retirada do balão e transferida para um tubo de 15 mL junto com 4 mL de etanol 100%, obtendo concentração final de etanol 80% para precipitar o amido. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, foram colocados mais 4 mL de etanol 80% e após nova centrifugação descartou-se o sobrenadante. Em seguida, os tubos foram deixados destampados em capela para evaporar todo o etanol por 15 minutos, aproximadamente. O precipitado seco foi incubado em banho-maria a 37°C com 1 mL de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3 – 28 U/mL, Sigma A-7255) por 2 horas. Após esse tempo, foram adicionados 100 µL de 0,6M Ácido perclórico para interromper a reação. Alíquotas de 100 µL de amostras foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 1,5 mL de GOD-

POD e foram incubados por 15 minutos em banho-maria a 37°C. Depois do resfriamento dos tubos, a absorbância das amostras foi mensurada a 450nm em espectrofotômetro e, em seguida, foi feito o cálculo para determinar a porcentagem de amido nas amostras.

4.3. Extração dos polissacarídeos não-amido solúveis em água

A extração de polissacarídeos não-amido solúveis em água foi feita a partir do método descrito por Shiga e colaboradores (2011), de acordo com as etapas descritas a seguir.

4.3.1. Extração com clorofórmio / metanol

Para inativar enzimas e extrair lipídeos e pigmentos das amostras, cerca de 15 g da amostra previamente liofilizada e pulverizada foram extraídas com aproximadamente 150 mL da solução clorofórmio / metanol (1:1). Após incubações em banho-maria por 20 min a 60°C dentro da capela, as amostras foram filtradas em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 µm (120 fios) e o filtrado foi descartado. Esse processo de extração foi repetido com o material retido na filtração por mais 3 vezes.

4.3.2. Extração com etanol a quente

Com o intuito de extrair pigmentos, ácidos orgânicos, sais minerais e proteínas, após o processo por extração com clorofórmio/metanol e filtragem, o material retido foi incubado com aproximadamente 150 mL de etanol 80% em banho-maria por 10 minutos a 100°C dentro de capela. Esse material foi filtrado em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 µm (120 fios) e o filtrado foi descartado. Esse processo de extração foi repetido com o material retido na filtração por mais 3 vezes.

4.3.3. Remoção de amido e obtenção das frações polissacarídicas SeRI e SeSE

Após a etapa de extração com etanol à quente, foi feita a remoção de amido no material que foi retido dessas filtrações. Para isso, foi adicionado à esse material 150

mL de tampão 0,05M Fosfato de sódio (pH 6,0), 500 µL de α-amilase (EC 3.2.1.1 – 3 U/mL) e incubou-se em banho-maria por 1 hora a 90°C com agitação. Depois do resfriamento à temperatura ambiente, ajustou-se o pH para 4,5 e adicionaram-se 1000 µL de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3 – 3,3 U/mL), sendo a mistura incubada em banho-maria por 1 hora a 60°C com agitação. Após resfriamento à temperatura ambiente e ajuste do pH para 7, foi feito o teste para a presença de amido residual com lugol, utilizando como referência positiva o amido de batata e albumina sérica bovina como referência de material negativo para amido.

Depois da testagem para presença de amido, foi feita filtragem da mistura em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 µm (120 fios). O material retido (resíduo insolúvel) foi separado para posterior obtenção da outra fração do estudo (SeRI), a qual será descrita mais adiante. O sobrenadante foi recuperado e a ele foi adicionado etanol absoluto em volume suficiente para resultar na concentração final de etanol 80% ficando mantido a 4°C (overnight – 12 a 14h) para a precipitação dos polissacarídeos. Após sedimentação do precipitado, a amostra foi filtrada em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 µm (120 fios) e este material retido correspondeu à fração polissacarídica do chuchu extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido denominada de SeSE.

Quanto ao resíduo insolúvel separado da filtragem após a determinação de amido, foram adicionados 100 mL de água ultrapura (sistema de purificação Milli-Q) em 15g dessa amostra e a suspensão mantida sob agitação por 30 minutos. Após filtração em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 µm (120 fios), o filtrado foi recuperado e esse processo foi repetido por 3 vezes, sendo que depois os filtrados foram combinados. Em seguida, adicionou-se volume de etanol absoluto a fim de se obter a concentração final de etanol 80%, sendo a mistura mantida a 4°C (overnight – 12 a 14h) para a precipitação dos polissacarídeos. Após sedimentação, a suspensão foi filtrada em tecido serigráfico de poliéster com poros de 5 µm (120 fios) e o material retido correspondeu à fração polissacarídica do chuchu extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido, denominada de SeRI. Na figura 1 pode-se observar um esquema simplificado de como foi feita a obtenção dessas frações.

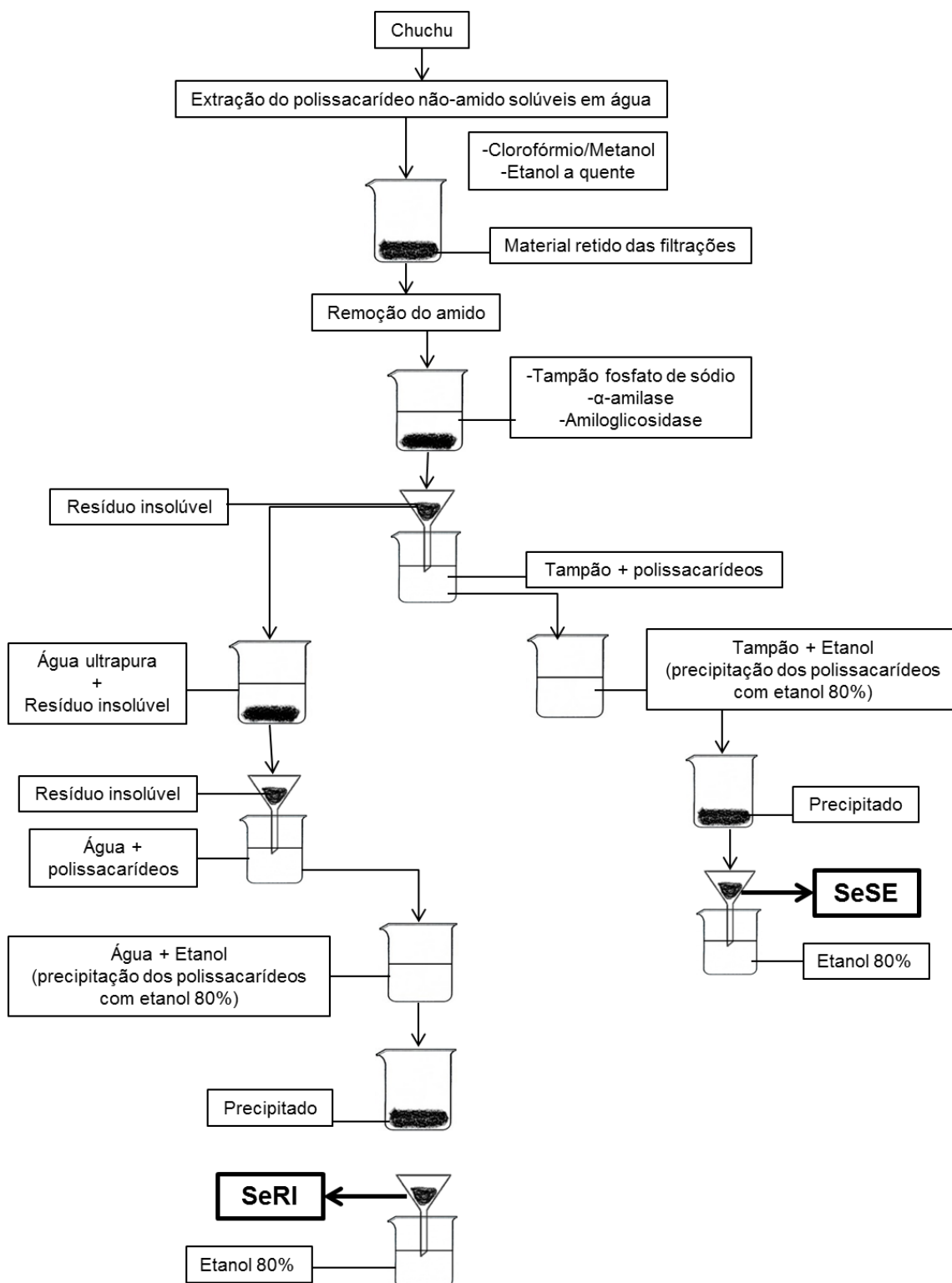


Figura 1- Esquema simplificado da obtenção das frações polissacarídicas do chuchu (*Sechium edule*), onde SeSE é a fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido e SeRI é a fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido.

4.3.4. Inativação de enzimas e obtenção das frações polissacarídicas secas

Após a extração das frações polissacarídicas solúveis em água, foi feita a inativação das eventuais enzimas residuais utilizadas para retirada do amido. Essa inativação consistiu em incubar as amostras (cerca de 15g) com mistura de clorofórmio/metanol (1:1) (cerca de 150 mL) em banho maria por 15 minutos a 70°C. Em seguida, a suspensão foi filtrada e o material retido na filtração foi lavado com etanol 80% e posteriormente, com acetona (cerca de 150 mL). O resíduo foi deixado para secar em temperatura ambiente até evaporar por completo o solvente por, aproximadamente, 3 dias. Finalmente, o resíduo seco correspondente às frações solúveis em água extraídas do resíduo insolúvel e do sobrenadante, ambas pós tratamento enzimático, SeRI e SeSE (respectivamente), foi solubilizado em água ultrapura para posterior dessalinização.

4.3.5. Dessalinização da amostra

Para dessalinização, as soluções correspondentes às SeRI e SeSE foram dialisadas contra água ultrapura empregando uma membrana de diálise SpectraPor3® (exclusão M.W 3.500 kDa). A diálise foi feita por 72h a 4°C sob agitação constante, com 3 a 4 trocas diárias de água para retirada de sais e contaminantes de baixo peso molecular e que fossem menores que o corte da membrana. Após a diálise, a SeRI e a SeSE foram congeladas e, posteriormente, liofilizadas. Depois de liofilizadas, as amostras foram armazenadas em dessecador sob vácuo à temperatura ambiente para futuras análises.

4.4. Determinação da presença de proteínas

A determinação dos teores de proteínas remanescentes nas preparações dos polissacarídeos solúveis em água foi realizada para assegurar sua pureza. Para essa análise foi utilizado o kit de ensaio de proteína empregando ácido bicinconínico (Bicinchoninic Acid – BCA) da Thermo Fisher Scientific, adaptado para microplaca.

Esse ensaio tem como premissa o uso de um detergente à base do ácido bicinconínico (BCA) para a quantificação de proteína total. Para isso, foram pesadas 3 mg da amostra em triplicata, as quais foram solubilizadas em 1 mL de água ultrapura. Como padrão foi utilizada solução de albumina sérica bovina (BSA) a 2 mg/mL.

Além disso, o perfil cromatográfico obtido da separação por cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho acoplada a um detector de índice de refração e um detector de comprimento de onda múltiplo (HPSEC-RID/ MWD), ajustado a 280 nm, também foi considerado para estimar a presença de proteínas.

4.5. Tamanho molecular e homogeneidade dos polissacarídeos

Para avaliar o tamanho molecular e a homogeneidade das frações dos polissacarídeos SeRI e SeSE, foi feita a análise por cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho acoplada a um detector de índice de refração e um detector de comprimento de onda múltiplo (HPSEC-RID/MWD). As análises foram realizadas em sistema Infinity (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) equipado com quatro colunas PL-aquagel-OH (60, 50, 40 e 30; 300 mm × 7,5 mm) conectadas em série. Como fase móvel foi utilizada uma solução de 0,05M Nitrito de sódio com Azida sódica (0,2 %), em fluxo constante de 0,6 mL/min. A separação foi monitorada por detector de índice de refração, com célula de fluxo mantida a 35°C. Os tempos de retenção de padrões de dextranos de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma, EUA), nos tamanhos de 670, 410, 270, 150, 80, 50, 25, 12,5 e 5 kDa, foram usados para a curva de calibração. A partir disso, obtém-se o perfil cromatográfico de cada fração polissacarídica, SeRI e SeSE, com seus respectivos picos de pesos moleculares diferentes. Foi feita uma curva padrão e sua respectiva equação da reta para calcular os pesos moleculares dos picos encontrados nos cromatogramas das amostras utilizando os valores do log do peso molecular e dos tempos de retenção. Os pesos moleculares utilizados como padrão para a curva foram 5, 12,5, 25, 50, 80, 150, 270, 410 e 670 kDa.

4.6. Isolamento dos picos de diferentes pesos moleculares dos polissacarídeos

O isolamento dos picos de diferentes pesos moleculares encontrados tanto na fração SeRI como na SeSE foi feito utilizando uma coluna de filtração de fluxo tangencial. Para isso, foi utilizado aparato de ultrafiltração Pellicon XL Device (com área de filtragem 50 cm²) (Millipore, EUA) com limite de exclusão de 50 kDa acoplados a uma bomba (Peristaltic Pump P-1) com fluxo de 10 mL/min de água ultrapura como fase móvel. Ao final da separação, tanto o volume retido como o filtrado foram submetidos a HPSEC-RID/MWD para confirmação dos tamanhos dos picos encontrados. Foi feita uma curva padrão e sua respectiva equação da reta para calcular os pesos moleculares dos picos isolados encontrados nos cromatogramas das amostras utilizando os valores do log do peso molecular e dos tempos de retenção. Os pesos moleculares utilizados como padrão para a curva foram 5, 12,5, 25, 50, 80, 150, 270, 410 e 670 kDa. Após o isolamento, as frações polissacarídicas (SeRI e SeSE) passaram a receber denominações diferentes. As menores que o limite de corte da membrana de filtração foram chamadas de SeRI<50 e SeSE<50, e as maiores foram chamadas de SeRI>50 e SeSE>50. Por fim, todas elas foram congeladas e liofilizadas para análises posteriores.

4.7. Detecção de endotoxinas das frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50

A verificação da presença ou não de endotoxinas nas frações isoladas extraídas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) foi feita por meio do ensaio do Lisado de Amebócitos de Límulo (LAL), o qual avaliou quantitativamente a presença da endotoxina bacteriana gram-negativa. Essa análise foi feita antes dos ensaios com cultura celular, visto que a presença desta toxina poderia interferir nos resultados. Para isso, foi utilizado o Kit QCL-1000™ LONZA (LONZA, EUA), acrescido do inibidor β-G-blocker na proporção 1:1 (v/v) (LONZA, EUA) (SANSONE, 2017), seguindo as orientações do fabricante. O teste das amostras foi feito em triplicata, e incluiu um controle positivo (LPS) e um controle negativo ou branco, consistindo de água livre de endotoxina, fornecida com o Kit (LAL Reagent Water- LRW). Paralelamente ao teste,

foi feita uma curva padrão para determinar a concentração de endotoxina, também em triplicata.

Para o ensaio foi utilizada uma microplaca pré-acondicionada a 37 °C contendo nos poços alíquotas de solução de LPS correspondentes a 1, 0,75, 0,5, 0,25 e 0,1 EU/mL para a curva padrão e 50 µL para as amostras testadas. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de LAL em cada poço contendo as amostras e os pontos da curva, e a placa foi incubada a 37 °C ± 1 °C por 10 min. Após, foram adicionados 100 µL da solução de substrato e a placa foi incubada novamente nas mesmas condições de temperatura sob leve agitação. Após 6 min, adicionaram-se 100 µL de ácido acético (25%) para frear a reação. Ao final da reação, a absorbância de cada reação desenvolvida na placa foi lida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 405 nm (BioTek Synergy H1).

Para o cálculo dos teores de endotoxinas, a curva de calibração e as médias das absorbâncias foram subtraídas das médias das absorbâncias do controle negativo (branco). As amostras foram consideradas isentas de endotoxinas se apresentaram índices próximos ao limite inferior do kit (0,1 EU/mL) (LONZA, 2015).

4.8. Composição de açúcares neutros e ácidos urônicos das frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50

A determinação da composição de açúcares neutros e de ácidos urônicos das frações isoladas dos polissacarídeos do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) foi baseada na metodologia de Shiga *et al* (2017), por meio da cromatografia de troca iônica de alto desempenho acoplada a um detector amperométrico de pulso (HPAEC-PAD). Para isso, 2 mg das amostras foram homogeneizadas com 1 mL de 2M ácido trifluoroacético (TFA) e hidrolisadas em frasco de reação a 120°C por 90 minutos. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de álcool butílico terciário para ajudar na completa evaporação do TFA sob fluxo de N₂ a 45 °C. Após essa etapa, os hidrolisados foram ressuspensos em 1 mL de água ultrapura, homogeneizados e filtrados em filtro com poro de 0,45 µm (Millipore). Os monômeros de cada amostra foram separados em coluna CarboPac PA1, 250 mm x 4 mm, acoplado com a respectiva pré-coluna (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Os açúcares neutros: arabinose, fucose, galactose, glicose,

manose, ramnose e xilose, e os ácidos urônicos: ácido glicurônico e ácido galacturônico foram quantificados usando padrão externo.

4.9. Análise de ligação das frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50

As amostras das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) foram reduzidas por ativação com carbodiimida, utilizando o boridreto de sódio deuterado (NaBD₄), seguindo o protocolo descrito por Kim e Carpita (1992). Após a redução, essas amostras foram permetiladas, segundo metodologia descrita por Carpita e Shea (1989), e purificadas usando tetracloreto de carbono e solução de metanol de acordo com Gibeaut e Carpita (1991 a).

Para a identificação, a separação foi feita por cromatografia a gás usando coluna SP2330, 30 m x 0,25 mm e 0,20 µm de filme, Supelco® (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EUA), tendo hélio como gás de arraste, em cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massas por ionização por elétrons (GC-EIMS), Agilent, série 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As rampas de temperatura, fluxo do gás de arraste e temperatura do injetor seguiram a metodologia descrita por Carpita e Shea (1989).

4.10. Ensaio *in vitro* em macrófagos murinos raw 264.7 utilizando as frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50

4.10.1. Cultivo celular das células de macrófagos murinos RAW 264.7

As células de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 utilizadas nesse experimento foram cedidas de forma voluntária e de bom grado pelo Laboratório de Lípidos (Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP). Estas foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Thermo, EUA), contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas) em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ a temperatura de 37 °C. As células foram mantidas em repique a cada três dias, conforme as diretrizes da American Type Culture Collection (ATCC, 2017). Sua viabilidade e multiplicação foram acompanhadas por meio da contagem de células feita em câmara de Neubauer, utilizando o corante azul

de Tripán (1:1; v/v) (ATCC, 2017; PERES, 2005). As células de macrófagos murinos da linhagem de RAW 264.7 foram incubadas por cerca de 6 h para adesão celular (LEI *et al.*, 2015; LUND *et al.*, 2016).

4.10.2. Ensaio de macrófagos murinos RAW 264.7 com SeRI<50 e SeSE<50

Para os ensaios das diferentes concentrações das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, SeRI<50 e SeSE<50, quantidades apropriadas desses materiais foram dissolvidas em meio de cultura DMEM (Thermo, EUA) e filtradas em filtro com poro de 0,45 µm. Foram estabelecidos o Branco (contendo apenas meio de cultura), o Triton X-100 (0,2%), e o LPS (10 ng/mL) como grupos controles para os ensaios. Os grupos de tratamento com as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, SeRI<50 e SeSE<50, foram testados nas concentrações finais de 10, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL dessas frações em meio de cultura.

4.10.3. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7

O ensaio de viabilidade celular foi feito utilizando o método colorimétrico por meio da redução do corante 3- (4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma, EUA) (MORGAN, 1998; VISTICA *et al.*, 1991). As células foram colocadas em placas de 96 poços, com volume de 180 µL por poço, a concentração de $1,0 \times 10^6$ células por poço em meio de cultura DMEM, e adicionados de 20 µL dos materiais ou substâncias relativas aos tratamentos em análise. O experimento foi feito em triplicata biológica e triplicata técnica para todos os tratamentos analisados, e a incubação feita por 6h, 12h, 24h e 48 horas.

Após cada período de incubação, os sobrenadantes foram descartados e os macrófagos foram novamente incubados com 150 µL de MTT (0,5 mg/mL) por 3 h. Após essa etapa, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 100 µL de DMSO para, em seguida, ser feita a leitura em um leitor de microplacas (BioTek Synergy H1) num comprimento de onda de 540 nm. O resultado foi expresso em porcentagem de viabilidade quando comparado ao controle branco (REILLY *et al.*, 1998; LEMAIRE *et al.*, 2014).

4.10.4. Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio das células de macrófagos murinos RAW 264.7

Para o ensaio de detecção da produção de espécies reativas de oxigênio incubou-se as células com as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) nas concentrações finais de 10, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL em volume final de 180 µL por poço (1×10^6 cel/mL) em placas de 96 poços por 6h, 12h, 24h e 48 horas, a 37 °C, a 5% de CO₂, em atmosfera umidificada. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS previamente aquecido a 37 °C e adicionados em cada poço 100 µL de 2',7'- Diclorofluoresceína diacetato (H2DCFDA) 25 µM. As células foram novamente incubadas por um período de 45 min a 37 °C; em seguida, lavadas com PBS; sua fluorescência foi lida conforme configuração do leitor de microplaca BioTek Synergy H1 (Comprimento de onda de excitação: 485 nm; Comprimento de onda de emissão: 535 nm).

4.10.5. Ensaio de detecção de citotoxicidade em macrófagos murinos RAW 264.7

A estimativa da morte e lise celular ocasionada pelos tratamentos (SeRI<50 e SeSE<50) foi feita por meio do ensaio colorimétrico utilizando o kit LDH (Roche, Suíça), a partir da medida da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada do citosol das células lisadas para o meio de cultura celular em que se encontram. Para isso, as células cultivadas e ensaiadas em diferentes condições com SeRI<50 e SeSE<50, nas concentrações finais de 50 e 800 µg/mL, foram colocadas em placas de 96 poços com volume de 180 µL por poço (1×10^6 cel/mL), sendo incubadas por 24 horas, a 37 °C, em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Após a incubação, foram preparados os poços correspondentes aos controles positivo e negativo, aos quais foram adicionados 5 µL do Triton X-100 e do branco (apenas meio de cultura), respectivamente, sendo incubados por mais 15 min. Em seguida, foram adicionados em todos os poços a mistura de reação, 100 µL, seguida de incubação por mais 30 min a 25 °C. Ao final da reação, as placas foram agitadas por 10 s, e assim foi feita a leitura em leitor de microplacas (BioTek Synergy H1) utilizando um comprimento de onda de 490 nm. A

partir da leitura, o cálculo foi feito seguindo as instruções do fabricante (Cytotoxicity Detection Kit, Roche, Suíça), com base na porcentagem de morte celular, e levando em consideração as médias de absorvância dos controles (Triton X-100 e Branco). O resultado foi expresso em porcentagem de morte celular.

4.11. Ensaio *in vivo* em camundongos BALB/c utilizando as frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50

4.11.1. Imunização em camundongos por via oral (gavagem)

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA nº 584). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Instituto de Química / USP, e ficaram em gaiolas separadas, no mínimo 2 e no máximo 5 animais por gaiola, sem haver mistura de ninhadas; sob condições ambientais de umidade relativa de 55 ± 10 %, temperatura de 22 ± 2 °C; 15 - 20 trocas de ar por hora e ciclo claro / escuro 12C / 12E. Os animais foram submetidos a um período de adaptação ao local por pelo menos 1 semana, em seguida foram submetidos ao procedimento de ambientação de gavagem (apenas com água – 100 µL) por uma semana, e posteriormente foram submetidos às gavagens com os tratamentos calculados a partir do peso dos animais, não excedendo 150 µL.

O estudo consistiu de um total de vinte e oito (28) camundongos. Eles foram separados em 4 grupos contendo sete animais cada. Um grupo de animais recebeu água (água livre de endotoxina – LAL Reagent Water – LRW) e foi o grupo controle negativo (CN); a um segundo grupo foi administrado o Pululano (um polissacarídeo solúvel em água, com propriedades imunomoduladoras comprovadas), utilizado como controle positivo (CP) (1000 µg/mL); e os outros dois grupos de animais recebeu a fração isolada do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 ou SeSE<50) (1000 µg/mL).

4.11.2. Coleta de sangue periférico, baço e intestino delgado de camundongos

Após 24 horas de administração dos tratamentos por via oral (gavagem), os animais receberam Isoflurano por via inalatória, a 3 – 4%, até indução do efeito anestésico e depois a 2% para manutenção desse efeito. Previamente, foi feita a assepsia com álcool 70% do local da punção e o sangue foi colhido com seringa por meio da punção cardíaca (coletando aproximadamente 1,0 mL). Esse procedimento serve para evitar uma possível contaminação das células mononucleares pelas bactérias que estão presentes na pele e no pelo do animal. O sangue periférico foi colhido em tubo contendo anticoagulante EDTA-K3.

Após os animais serem eutanasiados por exsanguinação, foi feita uma incisão na região abdominal, onde foram retirados o baço e o intestino delgado, a partir da junção ileocecal (aproximadamente 0,5 cm abaixo do estômago e 1,0 cm acima do ceco). O baço foi colocado imediatamente em meio RPMI / 1640 (Gibco®), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) / solução de HEPES, l- glutamina, penicilina / estreptomicina e gentamicina (HGPG), refrigerado e mantido em gelo até processamento. Antes de ser colocado no meio de coleta, o intestino delgado teve seu interior lavado com uma solução CMF, a qual consistia de solução balanceada de Hanks (livre de cálcio e magnésio), tampão HEPES-bicarbonato pH 7,2 (100 mM HEPES / 250 mM de bicarbonato de sódio) e 20% de SFB. Todas as soluções utilizadas para coleta, para lavagem do intestino delgado e para digestão utilizando a colagenase foram preparadas seguindo o protocolo de SHERIDAN e LEFRANÇOIS (2012).

4.11.3. Separação de células mononucleares do sangue periférico de camundongos

A separação das células do sangue foi feita utilizando gradiente de concentração de Percoll (GE Healthcare Life Sciences ®) e meio RPMI (Gibco ®). Foram adicionados 5 mL de solução de 67% Percoll (67% de Percoll e 33% de RPMI) no fundo de um tubo cônico de 15 mL, previamente “lavado” com soro fetal bovino e cuidadosamente, sobre essa solução, foram colocados 8 mL do material coletado diluído em solução de 44% Percoll (44% de Percoll e 56% de RPMI). O material foi centrifugado por 20 min a 600 g

à temperatura ambiente e sem freio. Após a centrifugação, foi coletada a camada de células mononucleares visível na interface dos diferentes gradientes do Percoll, e a esta foi adicionada 10 mL da solução de R20, a qual era constituída por solução de RPMI com 20% de soro fetal bovino, e após foi centrifugado novamente por 30 min a 800 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado em tubo de 15 mL e congelado para posterior análise de citocinas das amostras frescas. O material precipitado foi ressuspenso em 1 mL de solução de R20 e contado em contador automático (TC20™ Automated Cell Counter - BioRad) para ser dividido para os ensaios diretos, e para ser colocada em placa de poliestireno contendo 24 poços em estufa 37°C sob atmosfera úmida de 5% CO₂ para cultura de células primária, seguidos de análises de citocinas e marcadores de superfície celular (linfócitos T e B) por citometria de fluxo.

4.11.4. Separação de células mononucleares do baço de camundongos

Após a coleta do baço, o mesmo foi colocado em placa de petri, cortado com ajuda de um bisturi em pedaços de aproximadamente 1 mm e colocado em meio para coleta, sendo mantido em refrigeração até o processamento. Esse material foi centrifugado a 1200 rpm por 5 min e seu sobrenadante foi coletado em tubo de 15 mL e congelado para posterior análise de citocinas das amostras frescas. O material precipitado foi colocado em frasco para cultura celular de 25 cm² contendo 20 mL de solução de colagenase (10% SFB, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 100 u/mL de colagenase, 1,5% solução 100x concentrada de HGPG em meio RPMI). O material foi digerido em banho-maria por 30 min a 37°C com constantes homogeneizações, e o processo de digestão foi interrompido colocando-se o tubo em banho de gelo.

Após a digestão, o tecido foi passado em uma micropeneira de 70 µm com o auxílio da parte externa do embolo de uma seringa de 3 mL, e da adição de aproximadamente 5 mL de meio R20, e as células foram coletadas em um tubo cônico de 50 mL. O material coletado foi passado em uma micropeneira de 40 µm e centrifugado a 200 g por 5 min em temperatura ambiente. No fundo de um tubo cônico de 15 mL, previamente “lavado” com soro fetal bovino, foram adicionados 5 mL de

solução de 67% Percoll e cuidadosamente sobre essa solução, foram adicionados 8 mL do material coletado diluído em solução de 44% Percoll. O material foi centrifugado por 20 min a 600 g a temperatura ambiente, sem freio. Após a centrifugação, foi coletada a camada de células mononucleares, a qual permaneceu na interface dos reagentes, sendo lavada com R20. O material precipitado foi ressuspenso em 3 mL de R20 e contado em contador automático (TC20™ Automated Cell Counter - BioRad) para que fosse dividido entre os ensaios diretos e para a cultura de células primária, colocada em placa de poliestireno contendo 24 poços em estufa 37°C sob atmosfera úmida de CO₂ a 5% seguidos de análises de citocinas e marcadores de superfície celular (linfócitos T e B) por citometria de fluxo.

4.11.5. Separação de células mononucleares do intestino delgado de camundongos

Após a coleta, o intestino foi colocado em uma placa de petri, onde toda a gordura presa ao órgão foi retirada, seu interior foi lavado com solução de CMF e o mesmo foi cortado longitudinalmente e em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, sendo colocado em meio para coleta e mantido em refrigeração até o processamento. Esse material foi centrifugado a 1200 rpm por 5 min e seu sobrenadante foi coletado em tubo de 15 mL e congelado para posterior análise de citocinas das amostras frescas.

Ao precipitado, foi adicionado 25 mL de solução de DTT (3,85 mg de DTT, 2,5 mL de solução 10x concentrada de HEPES, 2,5 mL de SFB, 20 mL de RPMI) em um frasco para cultura celular de 25 cm², colocado em banho-maria por 20 min à 37°C, com constantes homogeneizações. Depois foi centrifugado por 5 min a 1200 rpm, não descartando o sobrenadante que foi passado posteriormente em peneira de 70 µm, o qual continha linfócitos intraepiteliais. O sobrenadante foi centrifugado a 1200 rpm por 5 min e ressuspenso em 4 mL 44% Percoll, colocado sobre 2,5 mL de 67% Percoll e foi centrifugado por 20 min a 600 g T.A. sem freio. O tecido foi da peneira 70 µm, foi adicionado 25 mL de solução de DTT em tubo cônico de 50 mL e repetido o processo anterior. As células mononucleares dos dois processos utilizando DTT que ficaram na

camada intermediária do gradiente de Percoll foram lavadas e reservadas para ser juntada com o material da digestão.

Ao tecido remanescente, foi adicionado a solução de colagenase/DNase. Adicionou 20 mL de solução de colagenase a 37 °C e foi colocado em banho maria por 45 min a 37 °C em agitação constante. Após esse período, foi deixado por 5 min no gelo para parar a ação da enzima. Em seguida foi passado em peneira 70 µm. Lavou com 5 a 10 mL de R20 e centrifugou a 1200 rpm por 5 min. Ressuspendeu o sobrenadante com meio R20 e passou em peneira de 40 µm, lavou com 5 a 10 mL de RPMI sem soro e centrifugou a 1200 rpm por 5 min. Ressuspendeu o sobrenadante em 16 mL de 44% Percoll e homogeneizou vigorosamente com a pipeta para evitar aglomerados celulares, os quais podem ser perdidos na separação pelo Percoll; Foram usados 2 tubos de 15 mL para o isolamento de células mononucleares.

Adicionou-se no fundo de um tubo de 15 mL previamente “lavado” com SFB, 5 mL de 67% Percoll, e por cima, cuidadosamente, adicionou os 8 mL de 44% Percoll. Centrifugou por 600 g por 20 min, sem freio. Após a centrifugação, foi coletada a camada de células mononucleares, a qual permanece na interface dos reagentes e juntada com as duas do DTT, e foram lavadas com R20. O material precipitado foi ressuscitado em 3 mL de R20 e contado em contador automático (TC20™ Automated Cell Counter - BioRad) para que fosse dividido entre os ensaios diretos e para a cultura de células, colocada em placa de poliestireno contendo 24 poços em estufa 37°C sob atmosfera úmida de CO₂ a 5% seguidos de análises de citocinas e marcadores de superfície celular (linfócitos T e B) por citometria de fluxo.

4.11.6. Cultura de células primárias de camundongos

Após a separação das células mononucleares do sangue, do baço e do intestino delgado e após sua contagem, foi colocado em poços de placa de poliestireno 1 mL contendo 1×10^6 células/mL distribuídas em meio RPMI suplementado com 10% SFB (R10). A placa foi colocada em estufa à 37°C sob atmosfera úmida de CO₂ a 5% e mantida por pelo menos 2 horas para estabilizar ao novo meio. Após esse período, as células foram reestimuladas com as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) e com os controles (CN e CP) e mantidas em cultivo por 24

horas. Depois desse tempo de incubação, as células e o sobrenadante do meio de cultivo foram coletados para análise de produção de citocinas e de marcadores celulares imunológicos. Esse procedimento foi realizado de acordo com as recomendações da American Type Culture Collection (ATCC, 2014).

4.11.7. Análise de linfócitos T e B por citometria de fluxo

Aproximadamente 5×10^5 células do sangue, baço e intestino delgado das amostras frescas e das amostras mantidas em cultivo celular por 24 horas foram distribuídas em tubos de poliestireno 12x75 mm e incubadas com os seguintes marcadores: CD45, CD19, CD3, CD8, CD4 e Ly6c. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da empresa Becton & Dickinson (BD Pharmigen®), os quais foram previamente titulados, seguindo as recomendações do fabricante. Após incubação por 20 minutos no escuro, em temperatura ambiente, foram adicionados 500 μ L de PBS e o material foi centrifugado a 200 g por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado por inversão do tubo. O precipitado foi ressuspendido em 150 μ L de PBS e as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSVerser, sendo que os dados obtidos foram analisados no software FlowJo.

4.11.8. Análise de citocinas por citometria de fluxo

A análise de citocinas foi realizada utilizando o kit de citocinas inflamatórias para murinos Cytometric Bead Array (CBA – BD Biosciences) para dosar IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, IFN- γ , e TNF, seguindo as orientações do fabricante. Em um tubo de 15 mL foram adicionadas 10 μ L de cada bead de captura (correspondente a cada citocina a ser analisada / tubo de amostra), sendo esse tubo identificado como “Mix de beads de captura”. Por exemplo, se tivessem 15 tubos para serem analisados, seriam necessários 150 μ L de bead de captura de cada citocina a ser analisada. Em tubos plásticos 12x75 mm, foram adicionados 25 μ L da mistura de beads de captura, 25 μ L de amostra e 25 μ L do reagente de detecção PE. Foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente, no escuro, e em seguida, a cada tubo foi adicionado 0,5 mL de tampão de lavagem e centrifugado a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado foi ressuspenso em 150 μ L de tampão de lavagem em cada tubo, para posterior análise no citômetro de fluxo. Os dados foram analisados utilizando o programa FCAP Array (BD Biosciences).

4.12. Análise estatística

A análise estatística foi determinada com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 7.0 e os resultados foram expressos com média \pm desvio padrão. A análise estatística utilizada para os açúcares neutros e ácidos urônicos foi o teste de Tuckey com $p < 0,01$ (letras) e teste T com $p < 0,01$ (caractere *), e foi feito em triplicata. Para o ensaio de MTT e EROs foi utilizado o teste de Tuckey com $p < 0,05$, e foi feito em triplicata técnica e triplicata biológica. O ensaio de LDH foi feito com teste estatístico de Dunnett com $p < 0,1$, e também foi feito em triplicata técnica e triplicata biológica.

Para o ensaio *in vivo*, foram utilizados 7 animais por grupo de tratamento. Para o peso dos animais, utilizou o teste Tuckey com $p < 0,01$. Para o ensaio de citocinas e marcadores de superfície celular foi utilizado o teste estatístico de Tuckey com $p < 0,01$ (alguns foram com $p < 0,1$ especificados nas figuras) quando comparadas as amostras frescas e de 24h separadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação dos polissacarídeos do chuchu

Amido e proteínas tiveram que ser totalmente removidos das frações polissacarídicas de interesse, pois os mesmos interferem negativamente nos ensaios envolvidos no estudo.

No caso do amido, que é um polissacarídeo e tem em sua composição os homopolímeros de glicose, amilose e a amilopectina (AMARAL et al., 2007), ele pode interferir na caracterização das frações polissacarídica de interesse, prejudicando a determinação da estrutura, do tamanho e do peso molecular. Como o teor de amido encontrado nas amostras de chuchu deste estudo ficou em torno de 10% em base seca, sendo similar ao observado por Shiga *et al* (2015), foi necessário realizar um tratamento enzimático durante o processo de extração dos polissacarídeos não amido com α -amilase e amiloglicosidase, o qual se mostrou bastante efetivo. O tratamento com essas amilases foi capaz de hidrolisar o amido residual presente nas amostras de polissacarídeos do chuchu, o que foi confirmado por meio do teste utilizando coloração de amido por lugol.

A interferência de proteínas contaminantes nas frações polissacarídicas se deve ao fato de elas poderem estimular as células imunes, como os macrófagos e monócitos, e, assim, gerar respostas que não serão resultantes do estímulo causado pelas moléculas de interesse (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002). Diante disso, foi feita a quantificação de proteínas nas amostras de polissacarídeos do chuchu para verificar se a etapa de remoção destas por meio da extração por clorofórmio/metanol foi eficiente.

De acordo com o ensaio de quantificação de proteínas, concluiu-se pela ausência de proteínas nos polissacarídeos, visto que os valores de absorbância obtidos ficaram bem abaixo do limite de detecção da curva padrão. Além disso, foi observado também que na análise do perfil cromatográfico das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, SeRI<50 e SeSE<50 (Figura 3 A e B), não houve absorbância quando o detector de comprimento de onda múltiplo (MWD) foi ajustado para 280 nm para monitoramento da presença de proteínas.

5.2. Identificação e isolamento das frações extraídas dos polissacarídeos do chuchu

Os pesos moleculares dos componentes da SeRI, assim como da SeSE, foram determinados através da cromatografia de exclusão de tamanho (HPSEC). De acordo com essa análise, foram encontrados três picos em ambas as amostras (Figura 2), sendo que para a SeRI o primeiro pico apresentou um peso molecular de 1214 kDa, o segundo de 134 kDa e o terceiro de 5 kDa. Para a amostra SeSE, o primeiro pico apresentou um peso molecular de 1189 kDa, o segundo de 100 kDa e o terceiro de 5 kDa.

Após a identificação do tamanho molecular dos polissacarídeos correspondentes aos picos encontrados nas amostras SeRI e SeSE, passou-se para a etapa de isolamento dessas subfrações. Para este fim, foi utilizada filtração de fluxo tangencial com membrana com corte de peso molecular de 50 kDa, resultando na retenção de moléculas com peso molecular maior que 50 kDa e permeação de moléculas com peso molecular menor que 50 kDa. Para a continuação do estudo, foi escolhida apenas o permeado da filtração tangencial de corte em 50 kDa, correspondente apenas à fração de menor tamanho molecular que foi encontrada em ambas as amostras, SeRI e SeSE. A decisão de escolher a fração de menor peso molecular foi tomada com base em um estudo anterior, realizado por Castro-Alves e Nascimento (2016), no qual foram investigados os efeitos dos polissacarídeos extraídos da polpa do chuchu cru, do chuchu cozido e da água do cozimento na modulação da função de macrófagos RAW 264.7. Nesse estudo foi observado que na água do cozimento houve maior solubilização de polissacarídeos com proporção maior de moléculas de baixo peso molecular, principalmente arabinanos e homogalacturonanos, os quais mostraram forte influência nas respostas dos macrófagos. Diante disso, o material de estudo para as próximas etapas do experimento foram as frações isoladas e purificadas com peso molecular de 6 kDa, sendo denominadas de SeRI<50 e SeSE<50, as quais foram derivadas das frações solúveis em água extraídas do resíduo insolúvel e do sobrenadante após tratamento enzimático para retirada do amido (SeRI e SeSE, respectivamente).

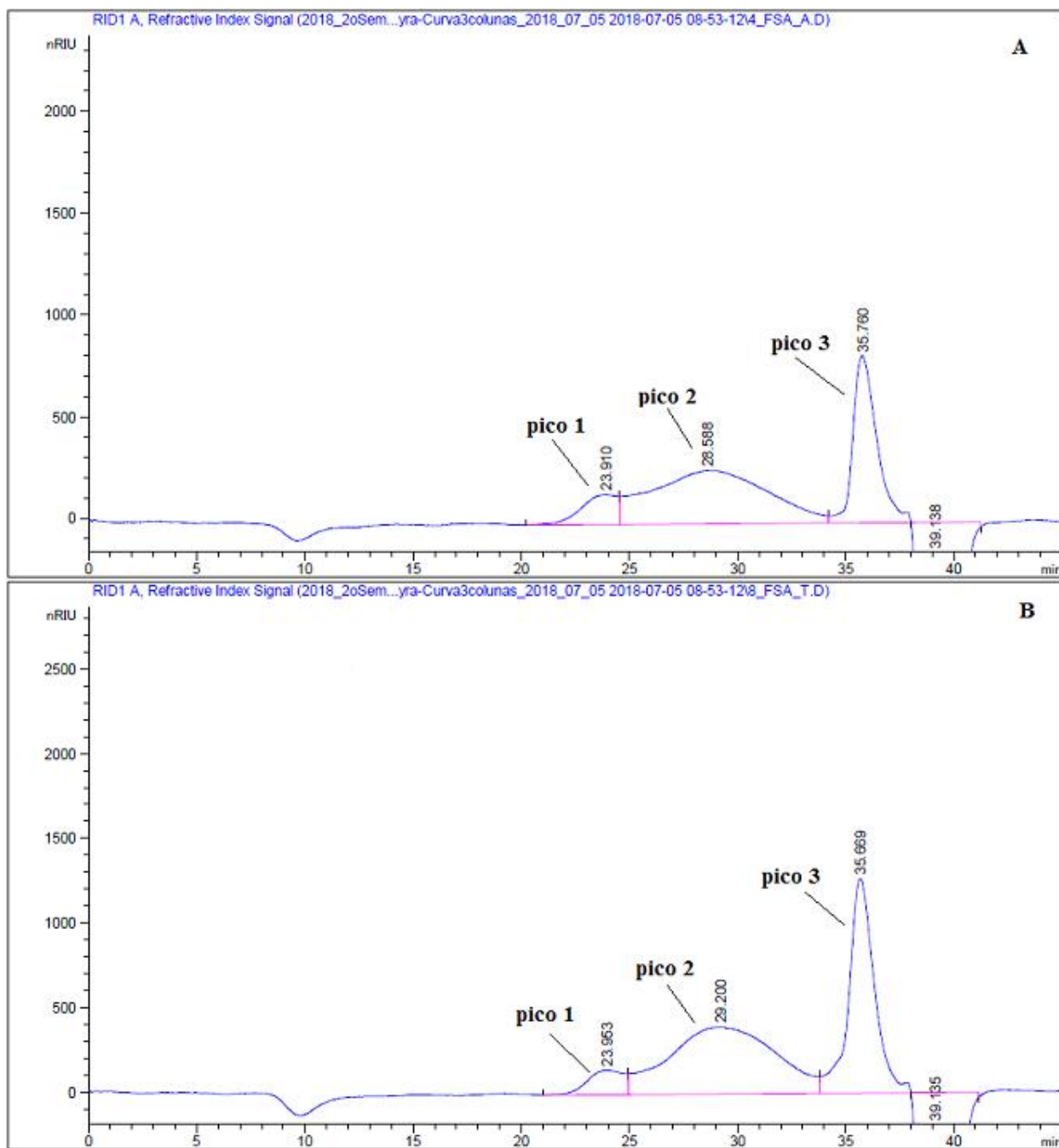


Figura 2- Perfil cromatográfico das frações totais do polissacarídeo do chuchu por exclusão de tamanho HPSEC-RID. (A) Perfil cromatográfico da amostra SeRI (fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido). (B) Perfil cromatográfico da amostra SeSE (fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido). No gráfico são apontados os 3 picos de pesos moleculares diferentes encontrados para cada amostra. Os números acima dos picos indicam o tempo de retenção. O eixo da abscissa equivale ao tempo de retenção (min) e o eixo da ordenada equivale ao índice de refração (nRIU – Refractive Index Unit).

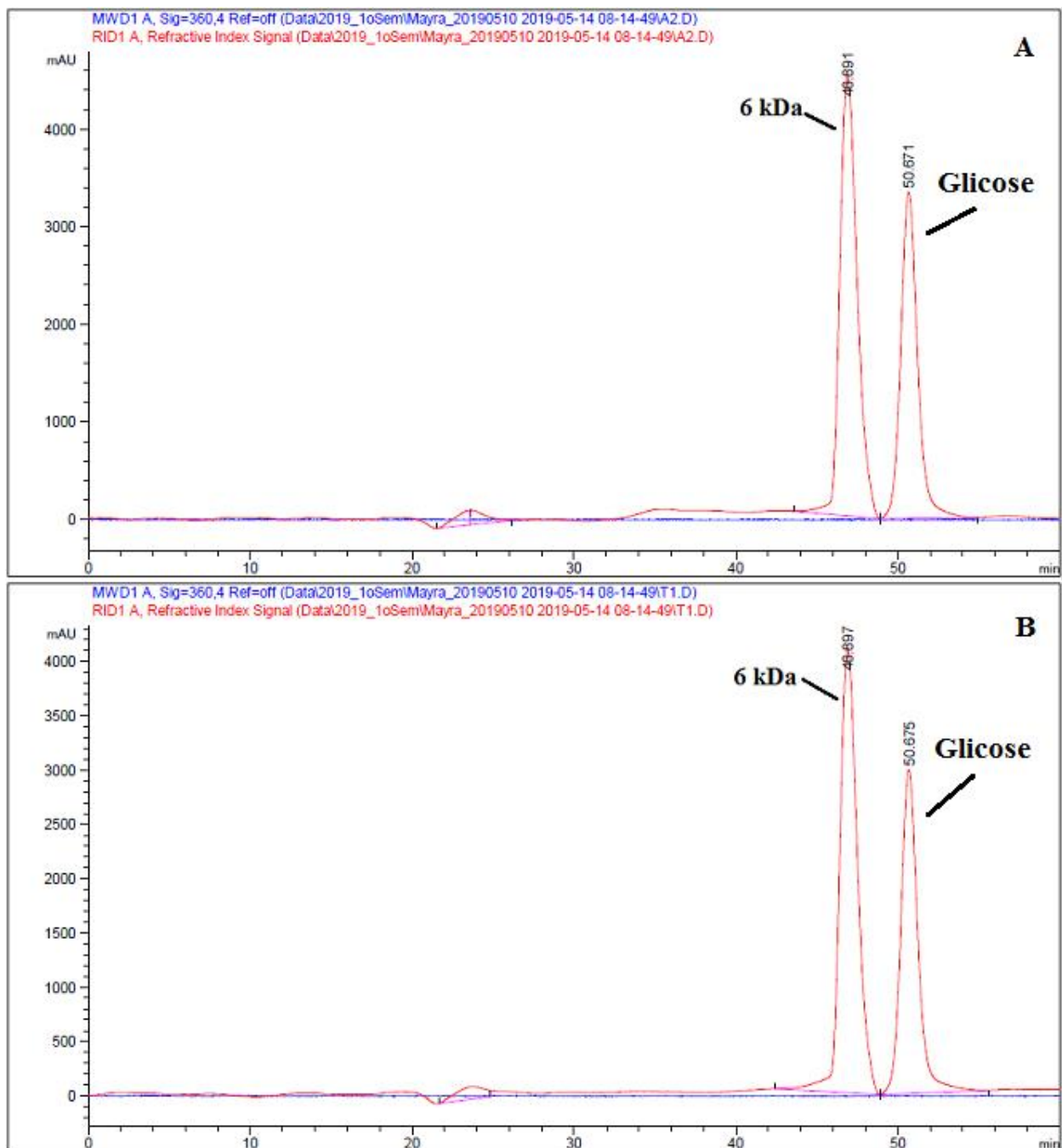


Figura 3- Perfil cromatográfico por HPSEC-RID das amostras (A) SeRI<50, correspondente ao permeado da separação por fluxo tangencial com membrana de corte de 50 kDa da fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido e (B) SeSE<50, correspondente à fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido do polissacarídeo do chuchu. Nos perfis de eluição das amostras (em vermelho) estão indicados os picos correspondentes a 6 kDa e o da glicose indicando o final da separação. Os valores anotados acima dos picos indicam o tempo de retenção. Em azul é mostrado o perfil de eluição monitorado a 280 nm para a detecção de proteínas. O eixo das abscissas equivale ao tempo de retenção (min) e o eixo das ordenadas equivale ao índice de refração (nRIU – Refractive Index Unit).

Após o isolamento das subfrações SeRI<50 e SeSE<50 por filtração tangencial, elas foram submetidas à cromatografia por exclusão de tamanho para confirmar os pesos moleculares encontrados. Na figura 3 podemos observar que, como previsto, foi possível isolar apenas a fração de menor peso molecular de ambas as amostras, correspondendo a um pico de, aproximadamente, 6 kDa tanto na SeRI<50 (Figura 3A) como na SeSE<50 (Figura 3B).

Esses dados mostram que existem claramente três picos originados das frações principais do polissacarídeo do chuchu, tanto da SeRI como da SeSE. Além disso, a separação utilizando membranas de filtração de fluxo tangencial foi eficaz, pois foi possível isolar e purificar a fração de menor peso molecular (6 kDa) de ambas as amostras do polissacarídeo do chuchu. De forma similar, Ye e colaboradores (2008) também obtiveram sucesso ao separar as frações do polissacarídeo da alga marinha *Sargassum pallidum* utilizando filtração de fluxo tangencial para avaliar as atividades antitumorais e antioxidantes. Assim, o uso de membranas de filtração de fluxo tangencial pode ser considerado um bom método para isolar frações de polissacarídeos de diferentes pesos moleculares, pois além de ser um método eficiente, pode ser utilizado para processar um grande volume de amostra.

5.3. Análise de endotoxinas nas frações SeRI<50 e SeSE<50

A análise de endotoxinas em SeRI<50 e SeSE<50 revelou amostras isentas de toxinas, uma vez que os valores foram muito abaixo do limite inferior de detecção da curva que é 0,1 EU/mL, sendo comparáveis ao do ponto zero da curva (Figura 4). Desse modo, com elas foram classificadas como isentas de contaminação (LONZA, 2015), foi possível prosseguir com os próximos passos do experimento, uma vez que a presença da endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) poderia desencadear respostas inflamatórias (HARM; GABOR; HARTMANN, 2016) tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo*.

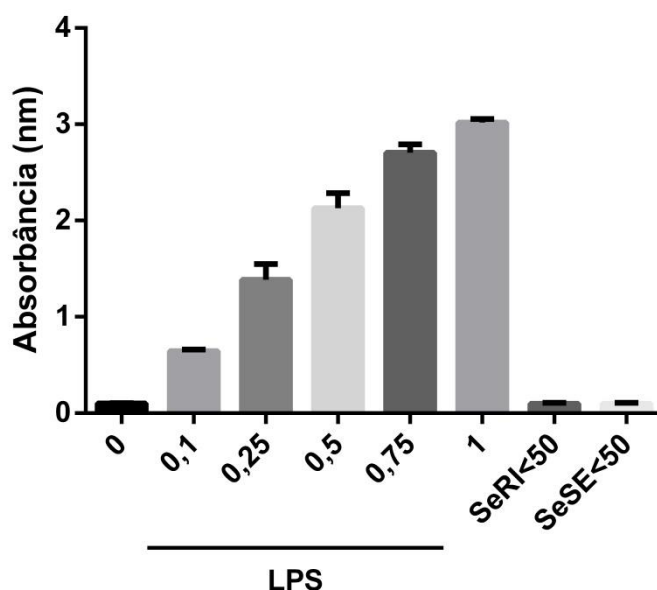


Figura 4- Ensaio para a presença de endotoxinas ($\text{EU}\cdot\text{mL}^{-1}$), por meio do teste do Lisado de Amebócitos de Límulo (LAL), em SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa, na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e em SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa, também na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O teste foi lido em espectrofotômetro a 450 nm e o cálculo para as amostras foi feito baseado na curva padrão estabelecida utilizando LPS em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 EU/mL) (lado esquerdo do eixo das abscissas).

5.4. Análise da composição das frações SeRI<50 e SeSE<50

Após isolar as frações SeRI<50 e SeSE<50, prosseguiu-se com sua caracterização, sendo a primeira etapa a determinação do perfil monossacarídico, utilizando a cromatografia de troca iônica de alto desempenho acoplada a detector amperométrico de pulso (HPAEC-PAD). Na figura 5 (A e B) estão apresentadas as concentrações encontradas para os açúcares neutros e ácidos urônicos que compõem estas frações.

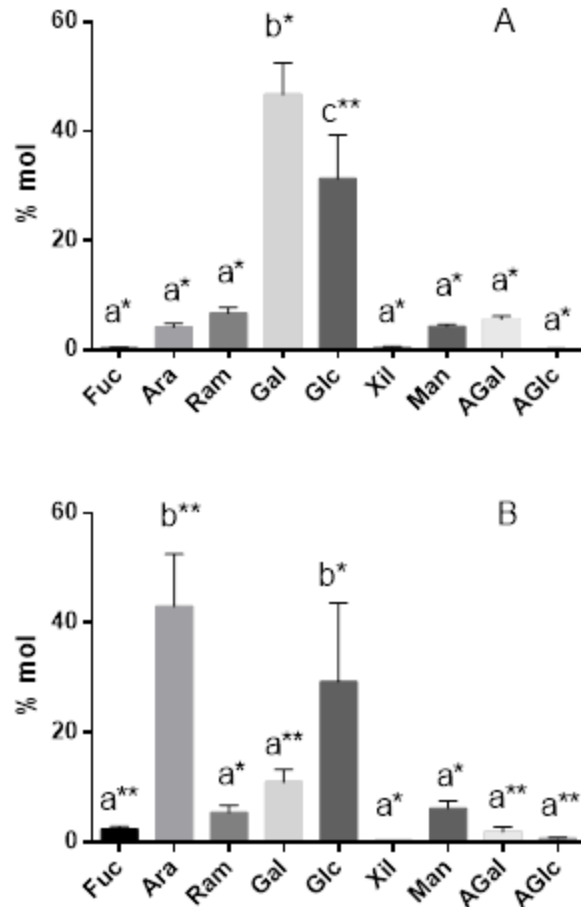


Figura 5- Composição monossacarídica das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, determinada por cromatografia de troca iônica (HPAEC-PAD). (A) SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e (B) SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. Entre os monossacarídeos foram analisados açúcares neutros – fucose (Fuc), arabinose (Ara), ramnose (Ram), galactose (Gal), glicose (Glc), xilose (Xil) e manose (Man); e foram analisados os ácidos urônicos – ácido galacturônico (AGal) e ácido glicurônico (AGlc). As letras sobre as barras (a, b, c) mostram a diferença estatística entre monossacarídeos da mesma amostra utilizando o teste Tuckey $p < 0,01$; e o caractere (*) mostra a diferença entre as amostras para o mesmo monossacarídeo utilizando o teste T $p < 0,01$. Letras ou caracteres iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Pode-se observar que houve maior concentração de galactose (46%) na fração isolada SeRI<50, enquanto que na fração isolada SeSE<50 encontrou-se maior concentração de arabinose (43%). Em ambas as frações foi encontrada concentração alta de glicose (31% e 29%, respectivamente) quando comparada aos outros monossacarídeos. Castro-Alves e Nascimento (2016) encontraram na composição

monossacarídica do polissacarídeo solúvel em água do chuchu, maiores teores de galactose, arabinose e ácido galacturônico; e Shiga e colaboradores (2015) encontraram teores maiores de arabinose e galactose também no polissacarídeo solúvel em água do chuchu.

Apesar das amostras do presente estudo serem de apenas de uma das frações do polissacarídeo não amido solúvel em água, os resultados obtidos são concordantes com aqueles reportados para os polissacarídeos solúveis em água do chuchu descritos por ambos os autores citados, pois mostram que os monossacarídeos das frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50 são formados principalmente por galactose e arabinose (respectivamente), como os dois monossacarídeos majoritários, seguidos da glicose.

A análise desse perfil de monossacarídeos fornecidos por HPLC sugere que ambas as frações isoladas (SeRI<50 e SeSE<50) possuem galacturonanos em sua composição. Além disso, o elevado teor de ramnose sugere que sua estrutura é formada principalmente de ramnogalacturonanos. Entretanto, a composição monossacarídica das duas frações isoladas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) é visivelmente diferente. A SeRI<50 apresenta grande quantidade de galactose, indicando presença de galactanos, enquanto a composição da SeSE<50 sugere grande quantidade de arabinanos. Além disso, a fucose presente na fração SeSE<50, sugere a presença de xiloglicanos.

Esses dados são corroborados com o perfil de monossacarídeos permetilados (Figura 6), obtidos pela análise de ligação dessas subfrações, pois tanto a SeRI<50 como a SeSE<50 são formadas principalmente por monossacarídeos neutros, provavelmente, por galactanos, arabinanos, arabinogalactanos e glicomananos.

Observa-se também, que a composição desses monossacarídeos permetilados da SeRI<50 e da SeSE<50 são muito diferentes, tanto estruturalmente como quimicamente. Na fração SeRI<50 são menos ramificados que os da SeSE<50, e isso é perceptível devido à grande quantidade de monossacarídeos terminais (*t-Ara*, *t-Gal*, *t-Glc*) presentes nesta fração isolada do polissacarídeo extraído do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido. Parte da glicose terminal encontrada (*t-Glc*), provavelmente, deve ser proveniente de galactoglucomananos, visto que o chuchu possui elevada quantidade desse polissacarídeo como mostrado no estudo de

Shiga e colaboradores (2015); uma outra parte talvez possa ser remanescente da hidrólise do amido.

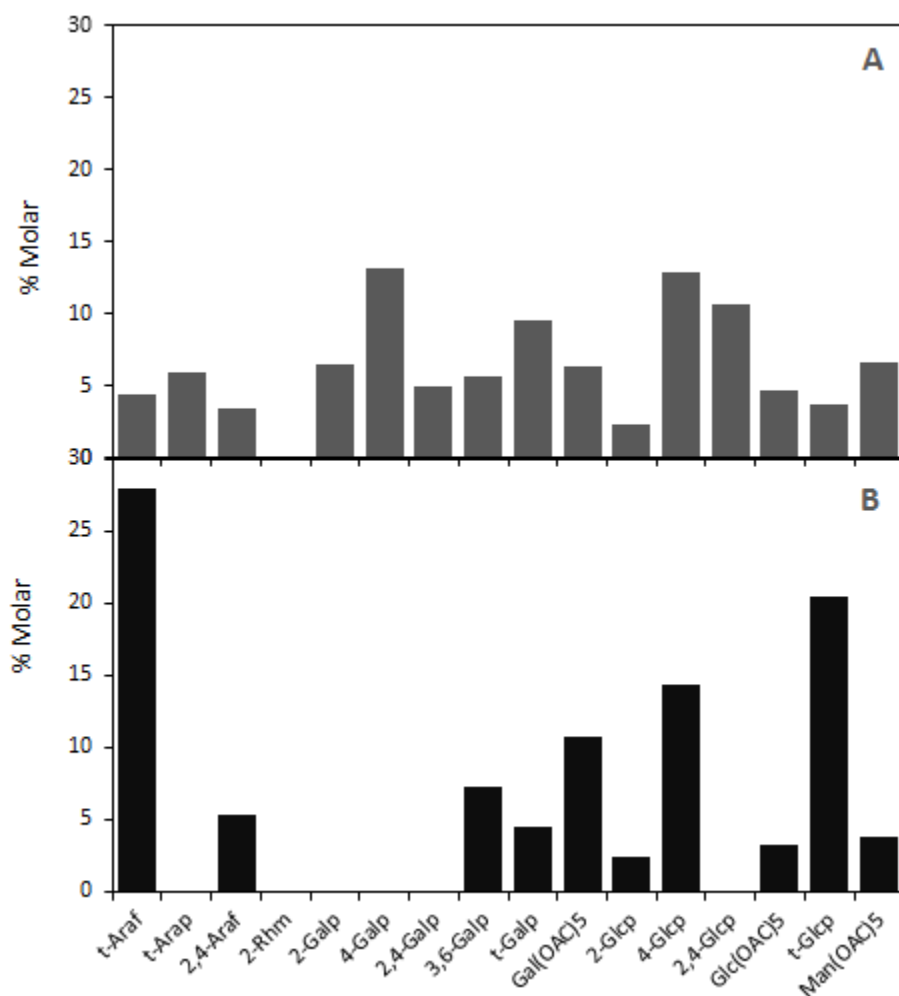


Figura 6- Composição de monossacarídeos permitilados, não reduzidos, por ativação por carbodiimida, das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, por meio da análise de ligação. (A) SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e (B) SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. Estão apresentados apenas os monossacarídeos neutros.

A fração isolada SeRI<50 apresenta em sua estrutura mais galactanos de cadeias curtas, pois apresentam maior quantidade de 4-Galp. Além disso, há também a presença de arabinogalactanos, os quais são identificados pela presença de 2-Galp, 2,4-Galp e 3,6-Galp. Estes arabinogalactanos são mais curtos do que os presentes na

SeSE<50, visto que nesta fração há mais *t-Galp*. Provavelmente, essa fração também é rica em arabinanos muito curtos e ramificados, além de galactanos ramificados. Pode-se observar semelhança no resultado encontrado no estudo de Shiga e colaboradores (2015) quanto à presença de galactanos e arabinogalactanos no polissacarídeo solúvel do chuchu. Na composição de ambas as frações isoladas, SeRI<50 e SeSE<50, há também a presença de glicomananos.

O entendimento sobre as características da estrutura dos polissacarídeos, como sua composição, é importante, visto que ela pode influenciar nos efeitos imunomoduladores produzidos por células, como os macrófagos (LIU et al, 2016). Alguns estudos têm reportado atividade imunomoduladora decorrente da composição monossacarídica dos polissacarídeos, como, por exemplo, o estudo de Currier, Lejtenyi e Miller (2003) que observaram esse efeito com arabinogalactanos e o estudo de Yermak et al (2012) com galactanos.

5.5. Efeito das frações SeRI<50 e SeSE<50 em macrófagos *in vitro*

Os macrófagos murinos, representados pelas células RAW 264.7, foram incubados e tratados com as frações polissacarídicas isoladas do chuchu, SeRI<50 e SeSE<50, e foram avaliados quanto à viabilidade celular (MTT), presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citotoxicidade (LDH).

5.5.1. Efeito de SeRI<50 e SeSE<50 na viabilidade celular (MTT)

Na figura 7, é apresentada a viabilidade das células RAW 264.7 quando tratadas com as frações isoladas SeRI<50 e SeSE<50 em diferentes concentrações e tempos de incubação. A viabilidade celular foi avaliada através do teste colorimétrico de redução do MTT, o qual avalia de forma rápida e indireta o quanto as células estão metabolicamente ativas. As desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas reduzem o sal solúvel tetrazólio que apresenta uma coloração amarelada, transformando-o em formazano, que é um cristal insolúvel e que apresenta coloração púrpura. (PIZZOFERRATO et al, 1992; VILLANUEVA et al, 2012).

Para o ensaio, foram utilizados dois grupos controles: o das células que não foram estimuladas com os tratamentos, sendo apenas acondicionadas em meio de cultura (Branco); e o das células que foram submetidas à ruptura na membrana celular, devido ao alto poder disruptivo do detergente Triton X-100 (KOLEY; BARD, 2010). Os cálculos para todas as amostras foram feitos considerando os valores já descontados do controle Branco.

Em geral, no tratamento dos macrófagos com a fração isolada SeSE<50 (extraída do sobrenadante pós-tratamento enzimático para retirada do amido), não foi observada diminuição da viabilidade celular decorrente da redução do MTT com o aumento do tempo de incubação e com o aumento das concentrações (Figura 7). Em relação ao controle Branco (que não sofreu estímulo), apenas não houve diferença significativa com os tratamentos no tempo 6h. No período de 12h e 24h, as células tratadas com a concentração mais alta (800 µg/mL) diferiram significativamente do controle branco, e essa mesma concentração diferiu também no tempo de 48h junto com os tratamentos de 200 e 400 µg/mL dessa mesma amostra, que foram significativamente diferentes também das demais concentrações; sem haver diferença significativa entre elas três. Pode-se dizer, então, que para a amostra SeSE<50 extraída do sobrenadante pós-tratamento enzimático não houve diminuição da viabilidade celular com o aumento das concentrações testadas e também por incubação de até 48 horas.

Ainda sobre a SeSE<50, ao analisar as concentrações individualmente ao longo dos diferentes tempos de incubação, observa-se que apenas as concentrações de 10 e de 100 µg/mL reduziram significativamente a viabilidade celular se comparado o início da incubação (tempo 6h) com o final (tempo 48h). Entretanto, para as maiores concentrações testadas (200, 400 e 800 µg/mL) isso não foi observado; pelo contrário, elas se mantiveram estatisticamente sem diferença significativa ao longo do tempo de incubação. Isso mostra que o período em que as células ficaram incubadas não foi um fator determinante para influenciar na viabilidade celular dessas 3 concentrações da amostra SeSE<50.

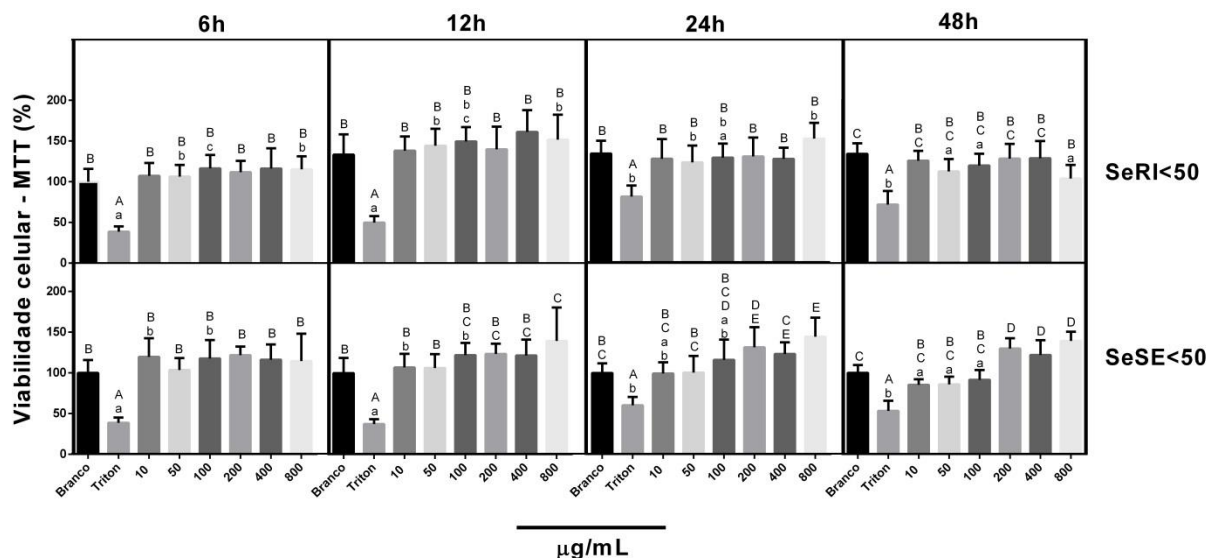


Figura 7- Viabilidade celular estimada pelo ensaio com MTT de macrófagos RAW 264.7 incubados com as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu. SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. Para o cálculo do percentual da viabilidade foram considerados os valores descontados do controle branco (células tratadas apenas com meio de cultura). As amostras foram testadas em diferentes concentrações: 10, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL, sendo o branco e a incubação com Triton X-100 usados como controles, e nos tempos de incubação de 6h, 12h, 24h e 48 horas. Letras maiúsculas (A, B, C, D, E) mostram a diferença estatística entre as concentrações em relação aos controles em cada tempo de incubação. Letras minúsculas (a, b, c) mostram a diferença estatística de uma mesma concentração em relação aos períodos de incubação. A análise estatística foi feita por meio do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Analisando os resultados da amostra SeRI<50 (extraída do resíduo insolúvel pós tratamento enzimático para retirada do amido) (Figura 7), foi observado que não houve diferença significativa das diferentes concentrações em relação ao Branco (apenas meio de cultura) para cada tempo de incubação, com exceção da concentração de 800 µg/mL que em 48h apresentou valor significativamente mais baixo que o controle. Além disso, essa maior concentração, também se destacou quando as concentrações foram analisadas individualmente ao longo do tempo de incubação. Observou-se que houve redução após 48h, sugerindo que a fração SeRI<50 nessa concentração não foi capaz de manter a viabilidade celular além das 24h.

Os tratamentos com as amostras (SeRI<50 e SeSE<50) claramente diferiram dos resultados da incubação com o Triton X-100, em todas as concentrações testadas e em cada tempo de incubação. De fato, isso é esperado já que o Triton X-100 causa lise celular e, portanto, corresponde ao controle negativo de viabilidade celular.

Apesar de não ser possível comparar estatisticamente os resultados obtidos das duas amostras em estudo, SeRI<50 e SeSE<50, ao observar os gráficos (Figura 7) nota-se que elas afetaram as células de forma um pouco distinta durante o período de incubação com as diferentes concentrações. As células tratadas com a fração polissacarídica isolada do resíduo insolúvel (SeRI<50) aparentemente manteve a viabilidade dos macrófagos durante todo o período de incubação e mesmo com o aumento das concentrações. Já o tratamento com a fração polissacarídica isolada do sobrenadante (SeSE<50) aparentemente aumentou a viabilidade dos macrófagos durante o tempo de incubação e com o aumento das concentrações. De qualquer forma, em linhas gerais não se percebeu uma redução de viabilidade das células tratadas com ambas as frações em estudo.

No estudo de Castro-Alves e Nascimento (2016) em que o efeito do polissacarídeo do chuchu (cru, cozido e da água de cozimento) foi avaliado na modulação da função dos macrófagos, os autores observaram que para a concentração de 100 µg/mL no período de incubação de 24 horas, a viabilidade celular foi significativamente maior quando o tratamento foi feito com o polissacarídeo isolado do chuchu cru ou obtido da água de cozimento. No entanto, quando utilizada a concentração de 400 µg/mL, foi observada redução na viabilidade das células tratadas com o polissacarídeo do chuchu cozido. Isso mostra que, apesar de os polissacarídeos terem sido isolados da mesma matriz alimentar utilizada no presente estudo, mudanças na estrutura e na composição do polissacarídeo podem alterar significativamente suas respostas (CHEN et al, 2008; WANG; LUO, 2007).

5.5.2. Efeito de SeRI<50 e SeSE<50 na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio são metabólitos resultantes da redução parcial de oxigênio, como é o caso do óxido nítrico (NO), superóxido (O₂), hidroxilas (OH),

peroxila (ROO), alcoxila (RO), entre outras. Essas moléculas são bastante reativas e instáveis (CIRCU; AW, 2010; SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000; THANNICKAL; FANBURG, 2000), sendo produzidas através da cadeia respiratória da mitocôndria e por células inflamatórias durante estresse oxidativo, tendo potencial de danificar o DNA, lipídios e proteínas (FREEMAN; CRAPO, 1982; CIRCU; AW, 2010; SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000; MURPHY, 2009). Na figura 8, estão representados os resultados da produção de EROs em macrófagos tratados com diferentes concentrações das frações polissacarídicas SeRI<50 e SeSE<50 em diferentes tempos de incubação.

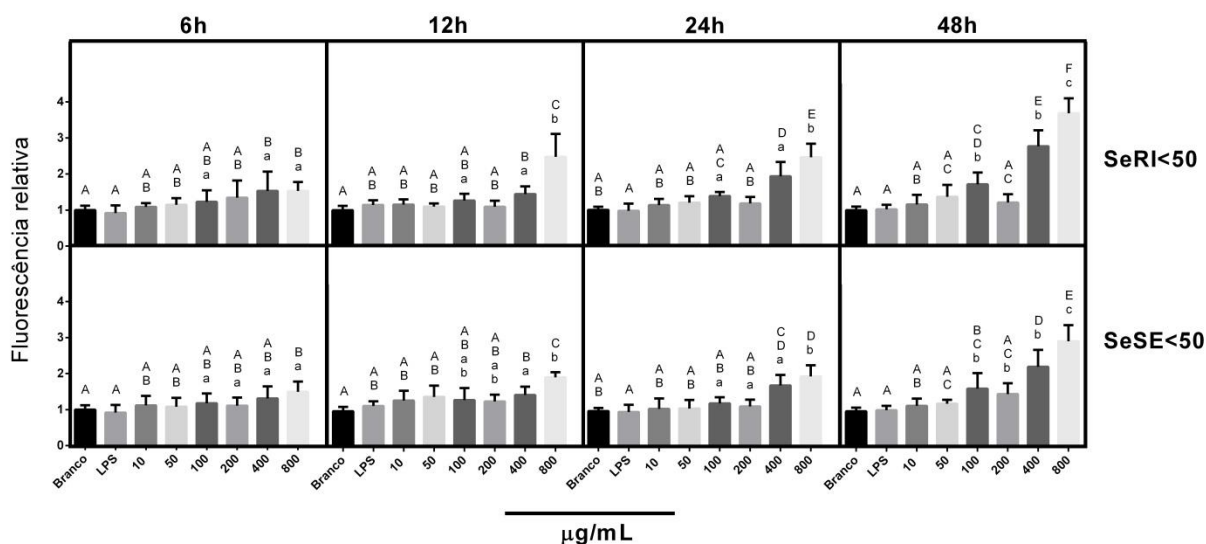


Figura 8- Produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos RAW 264.7 incubados com as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, medida por meio da fluorescência relativa. SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa. As amostras dos polissacarídeos foram testadas em diferentes concentrações: 10, 50, 100, 200, 400 e 800 µg/mL, sendo os controles negativo e positivo feitos por incubações, respectivamente, em meio de cultura apenas (branco) e meio de cultura adicionado de LPS (10 pg/mL), em tempos de incubação de 6h, 12h, 24h e 48 horas. Para o cálculo da fluorescência relativa foram considerados os valores descontados do controle branco. Letras maiúsculas (A, B, C, D, E, F) mostram a diferença estatística entre as incubações nas concentrações dos polissacarídeos em relação aos controles em cada tempo de incubação. Letras minúsculas (a, b, c) mostram a diferença estatística de incubações em uma mesma concentração em relação aos diferentes tempos de incubação. A análise estatística foi feita por meio do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Em relação ao controle Branco, que não sofreu estímulo, as células tratadas com as frações polissacarídicas SeRI<50 e SeSE<50 nas concentrações de 400 e 800 µg/mL apresentaram valores significativamente maiores de produção de EROs em todos os períodos de incubação (Figura 8). O mesmo aconteceu para a concentração de 100 µg/mL no período de 48 horas. Em relação ao controle positivo (LPS), pode-se perceber que ele não diferiu significativamente do controle branco. Talvez isso tenha acontecido porque o LPS tem uma ação aguda sobre o sistema, ou seja, ele sofre estímulo muito rápido na produção de espécies reativas, fazendo com que ele tivesse seu pico de produção antes do período de incubação analisado.

Ao analisar as concentrações individualmente durante o período de incubação (Figura 8), percebe-se que ambas as frações polissacarídicas, SeRI<50 e SeSE<50, tiveram aumento significativo na produção de EROs no período de incubação de 48h com as concentrações de 100 e 400 µg/mL, e o tratamento com concentração mais alta, 800 µg/mL, aumentou a partir do período de 12 horas. Apenas na amostra polissacarídica extraída do sobrenadante, SeSE<50, a concentração de 200 µg/mL apresentou aumento significativo no tempo 48h, diferente do que ocorreu na amostra extraída do resíduo insolúvel, SeRI<50.

Apesar de não poder comparar estatisticamente os resultados obtidos das duas amostras em estudo, SeRI<50 e SeSE<50, ao observar os gráficos (Figura 8) nota-se que, aparentemente, elas reagiram de forma bem semelhantes durante o período de incubação com as diferentes concentrações. As células tratadas com as frações polissacarídicas isoladas do resíduo insolúvel e do sobrenadante pós-tratamento enzimático para retirada do amido (SeRI<50 e SeSE<50, respectivamente) apresentaram produção elevada de espécies reativas com o aumento do período de incubação nas maiores concentrações utilizadas, mostrando que essa resposta ocasionada pelas células contribui para o mecanismo de defesa do organismo.

No estudo de Yu e colaboradores (2013), em que os autores avaliaram a atividade imunomoduladora do polissacarídeo da *Ganoderma atrum* em macrófagos RAW 264.7, observou-se um comportamento semelhante ao encontrado no presente estudo nas concentrações de 100, 400 e 800 µg/mL em relação à produção de EROs.

De acordo com os autores, o aumento da concentração do polissacarídeo houve um aumento da produção de EROs no tempo de incubação de 24 horas.

Os polissacarídeos extraídos de plantas geralmente estão associados à produção de EROs, de óxido nítrico, de citocinas (DU; LIU; WANG, 2015) e de espécies reativas de nitrogênio que podem ser associados ao poder antimicrobiano de macrófagos de agir contra bactérias, microrganismos patogênicos, células de câncer, entre outros (TAKO et al, 2010; PEKAROVA; KRALOVA; KUBALA et al, 2009). No entanto, apesar de essas espécies serem parte do mecanismo de defesa do hospedeiro, seu excesso também pode gerar doenças inflamatórias e autoimunes devido ao efeito oxidativo sobre os componentes lipídicos da membrana celular, como também no DNA e nas lipoproteínas das células, ocasionando uma condição pró-inflamatória (NIKOLOVA et al, 2013).

5.5.3. Efeito das frações isoladas (SeRI<50 e SeSE<50) no ensaio de morte celular (LDH)

Com o intuito de avaliar a potencial citotoxicidade das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) para as células RAW 264.7, foi feito o ensaio de atividade de LDH, como indicador de morte celular, avaliando a porcentagem com base no controle positivo representado pelo tratamento com Triton X-100. Este ensaio é baseado na morte celular causada pela ruptura da membrana da célula, em que a enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) é liberada para o sobrenadante da cultura de células e, por conseguinte, sua atividade é estimada (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983; WEYERMANN; LOCHMANN; ZIMMER, 2005).

Para essa avaliação foram testadas duas concentrações (50 µg/mL e 800 µg/mL) para verificar se o eventual efeito citotóxico poderia refletir a concentração do polissacarídeo testado. Como pode ser observado na figura 9, que apresenta os resultados desse ensaio, pode-se constatar que as amostras SeRI<50 e SeSE<50 não apresentaram toxicidade para os macrófagos murinos RAW 264.7 em nenhuma das concentrações quando incubadas por 24 horas.

Apesar de terem sido testadas concentrações diferentes no trabalho de Castro-Alves e Nascimento (2016), em que os autores avaliaram o efeito dos polissacarídeos extraídos do chuchu cru, do chuchu cozido e da água de cozimento na modulação da função dos macrófagos, o resultado apresentado foi semelhante. Assim como relatado no presente trabalho, os autores também não observaram toxicidade das amostras em macrófagos murinos RAW 264.7 quando em concentrações de 100 e 400 µg/mL.

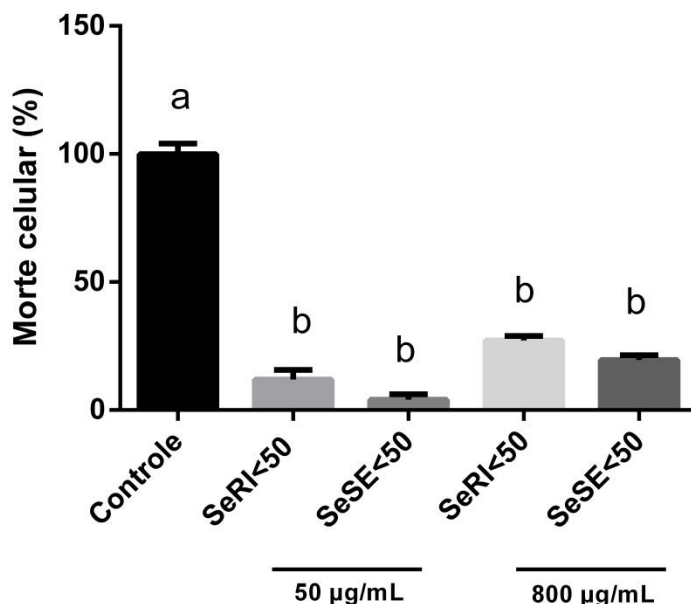


Figura 9- Ensaio de citotoxicidade das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu. A avaliação de morte celular foi feita por meio do ensaio de atividade de LDH liberada no meio de cultivo. Foram testadas as amostras: SeRI<50 – fração polissacarídica extraída do resíduo insolúvel depois de passar pelo tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa e SeSE<50 – fração polissacarídica extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa, ambas nas concentrações de 50 µg/mL e 800 µg/mL. A morte celular foi expressa em porcentagem relativa ao Triton X-100 (controle). As letras sobre as colunas (a, b) mostram a diferença estatística entre os tratamentos e o controle utilizando o teste de Dunnett- $p < 0,1$. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Diante do conjunto dos resultados obtidos com as análises de MTT, EROs e LDH nas frações isoladas do polissacarídeo do chuchu, é importante fazer algumas considerações a respeito de SeRI<50 e SeSE<50. Na figura 7, apesar de haver um aumento significativo da resposta da amostra SeSE<50 em relação ao tempo de incubação com o aumento da concentração, não se pode afirmar que houve um

aumento da atividade metabólica dos macrófagos por meio da redução do MTT pelas enzimas mitocondriais, visto que tem sido demonstrado que essa redução também pode ocorrer por via não mitocondrial com envolvimento de outras redutases intracelulares (BERRIDGE; TAN, 1993; JO et al, 2015).

A coenzima NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) também pode gerar uma resposta que não corresponde a alteração da viabilidade pois sendo uma doadora de elétrons pode levar à redução do sal tetrazólio (BERRIDGE; TAN, 1993; VISTICA et al, 1991). No entanto, ainda que não se possa dizer quem é o responsável, de fato, por esse aumento da atividade metabólica que leva à redução do MTT, podemos destacar que as amostras SeSE<50 e SeRI<50 não afetaram o metabolismo das células, uma vez que não houve diminuição com o passar do tempo de incubação nem com o aumento da concentração.

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio observado quando as células RAW 264.7 foram tratadas com as frações SeRI<50 e SeSE<50 (Figura 8), pode indicar que elas apresentam um perfil pró inflamatório, uma vez que essas espécies podem fazer parte da defesa, da modulação de apoptose celular, da sinalização, da regulação e da manutenção da resposta imunológica (KNIGHT, 2000; LI et al, 2017; FINKEL, 1998).

Além disso, a análise com a Lactato Desidrogenase (LDH) (Figura 9) mostrou que as frações do presente estudo, aparentemente, não causam morte celular, demonstrando que os resultados das análises de viabilidade celular e de espécies reativas são condizentes com as frações SeRI<50 e SeSE<50 terem efeitos imunomoduladores *in vitro* em macrófagos.

5.6. Efeito das frações SeRI<50 e SeSE<50 em camundongos BALB/c – modelo *in vivo*

Nessa etapa do experimento, camundongos da linhagem Balb/c, os quais apresentam resposta imune similar à que ocorre em humanos, foram tratados com as frações polissacarídicas isoladas do chuchu extraída do resíduo insolúvel e do sobrenadante pós tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular

menor que 50 kDa, SeRI<50 e SeSE<50, respectivamente, e foram avaliados quanto à produção de citocinas e de linfócitos por baço, sangue e intestino delgado.

5.6.1. Peso dos camundongos de linhagem BALB/c durante o ensaio agudo de 24h

Durante o ensaio, os animais foram pesados diariamente com o intuito de verificar se estaria havendo perda ou ganho de peso excessivo que levaria a destoar dos demais membros do grupo, uma vez que no início do experimento os animais foram pesados e organizados em grupos formados por indivíduos com pesos semelhantes. Da mesma forma, esse acompanhamento foi importante para verificar se haveria diferença entre os grupos dos tratamentos e controles, o que poderia indicar alguma condição prejudicial ao desenvolvimento dos animais e, conseqüentemente, comprometer o estudo. Na figura 10, observa-se que os valores das médias de peso dos animais foram de 24,75 g a 26,09 g e não variaram estatisticamente de um grupo para outro no final do experimento, momento em que eram pesados antes da gavagem.

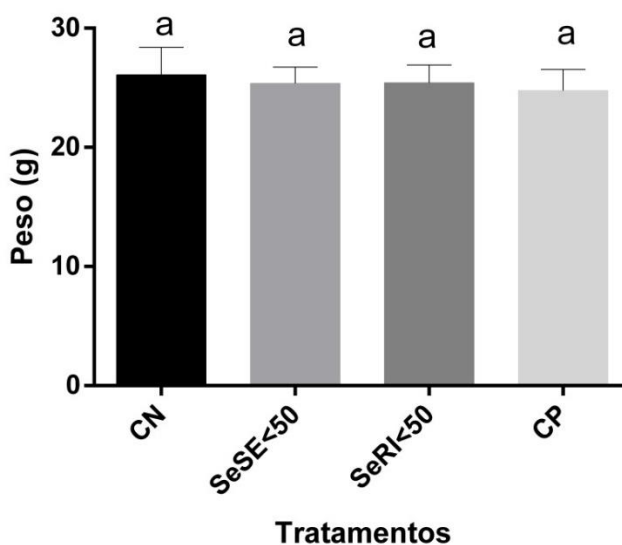


Figura 10- Peso final dos animais utilizados no ensaio *in vivo* correspondentes aos grupos tratados com água (controle negativo – CN), tratados com a fração polissacarídica isolada extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeSE<50), tratados com a fração polissacarídica isolada extraída do resíduo insolúvel após tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeRI<50) e tratados com Pululano (controle positivo – CP). As letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as médias utilizando o teste de Tuckey com $p < 0,01$, e as barras verticais indicam o desvio padrão da média.

5.6.2. Efeito de SeRI<50 e SeSE<50 na produção de citocinas em camundongos

Na figura 11, podem ser observados os resultados da análise de citocinas liberadas pelas células mononucleares das amostras frescas do baço, do sangue e do intestino delgado dos camundongos, bem como das citocinas liberadas no sobrenadante da cultura de células primárias do baço, do sangue e do intestino delgado dos camundongos cultivadas por 24h após reestímulo com CN, SeSE<50, SeRI<50 e CP.

Ao analisar a citocina IL-6, podemos perceber que para o baço ela apresentou concentrações maiores liberadas pelas células primárias que sofreram reestímulo cultivadas por 24h do que para as células frescas, quando tratadas com as frações polissacarídicas SeRI<50, SeSE<50. O mesmo ocorreu no intestino delgado e no sangue quando analisada a mesma citocina. Os camundongos tratados com as frações SeRI<50 e SeSE<50 apresentaram teor de IL-6 para as células cultivadas por 24h significativamente maior que o controle negativo (CN) no baço. Já no intestino delgado, essa produção de IL-6 apresentou um valor significativamente maior pelas células tratadas apenas com a fração SeRI<50 quando comparado com o controle negativo. No sangue, foi observado o mesmo comportamento apresentado no baço, as frações SeRI<50 e SeSE<50 apresentaram valores significativamente maiores de IL-6 pelas células cultivadas por 24h em relação ao controle branco.

Tanto no baço como no intestino e no sangue, a IL-6 foi mais expressa pelos tratamentos utilizando as frações polissacarídicas isoladas (SeRI<50 e SeSE<50), sugerindo que essas frações podem ter efeito pró-inflamatório, característica da IL-6. Essa citocina é induzida quando há perturbação da homeostase e está associada com a presença de uma inflamação leve gerada por resistência insulínica ou por obesidade, e também pode estar envolvida no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na liberação de produtos de origem lipídica (EDER et al, 2009). Coincidentemente, aumento de EROs foi observado em macrófagos murinos RAW 264.7 (Figura 8) quando tratados com essas frações, mostrando assim uma possível concordância da expressão elevada de IL-6 com a produção das espécies reativas.

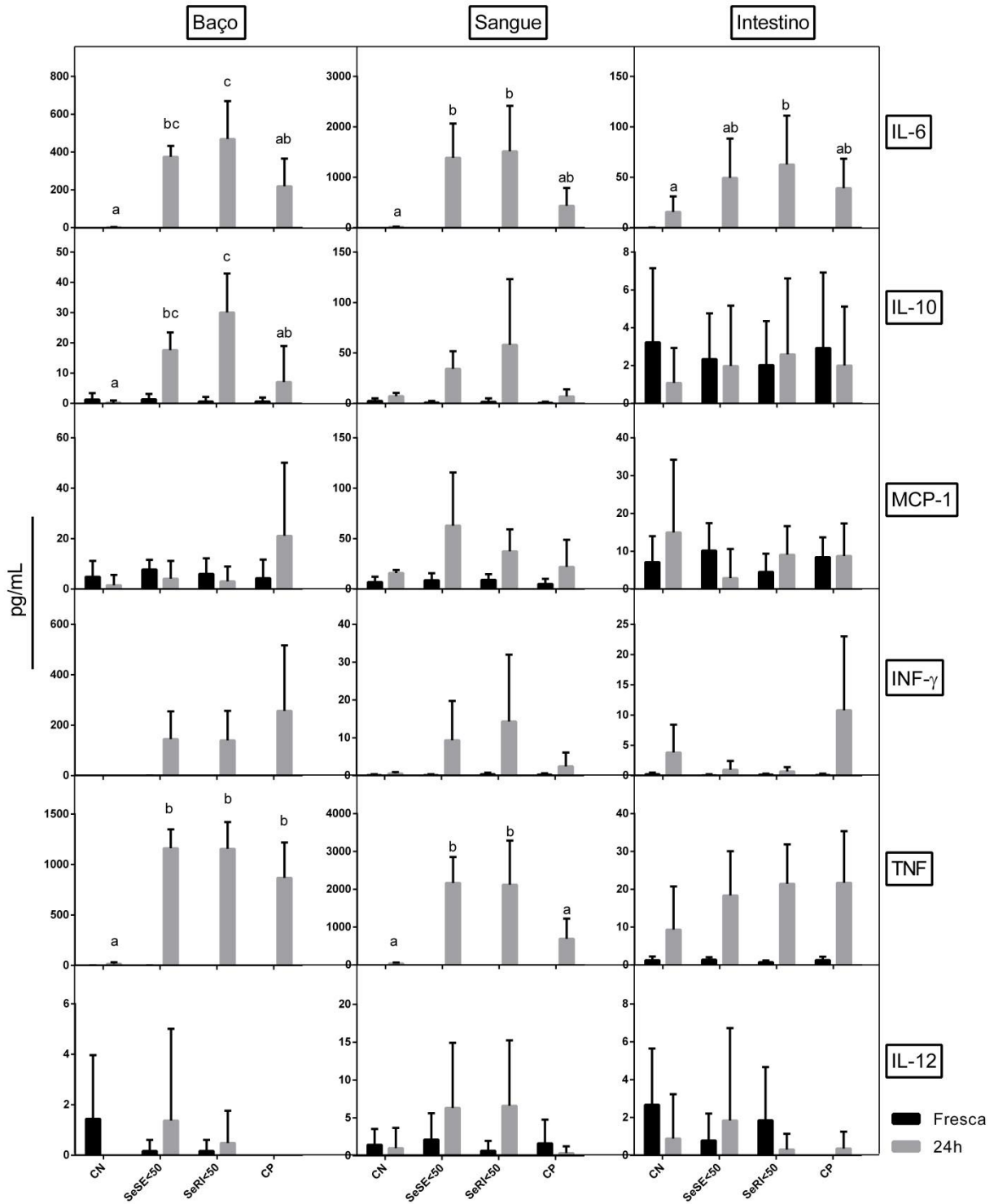


Figura 11- Citocinas produzidas por células mononucleares isoladas de amostras frescas de baço, sangue e intestino delgado de camundongos da linhagem balb/c e de células mononucleares isoladas desses tecidos e cultivadas por 24h após reestímulo. Os animais dos

diferentes grupos foram tratados com: água isenta de endotoxinas (Controle Negativo – CN), fração polissacarídica isolada extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeSE<50), fração polissacarídica isolada extraída do resíduo insolúvel após tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeRI<50) e Pululano (Controle Positivo – CP). Foram analisadas a produção de IL-6, IL-10, MCP-1, INF- γ , TNF e IL-12. Barras verticais indicam desvio padrão da média. As letras (a, b, c) acima das barras indicam diferença estatística entre os tratamentos utilizando o teste de Tuckey ($p < 0,01$). Caracteres omitidos indicam que as médias não diferiram estatisticamente entre si.

Geralmente a IL-6 está associada com a liberação de TNF, uma citocina pró-inflamatória, regulando inflamações locais e sistêmicas (XING et al, 1998). O TNF é uma citocina que tem relação com a inflamação, imunidade e apoptose celular, sendo associado a doenças como diabetes, câncer, esclerose múltipla (CHEN; GOEDEL, 2002) e doenças inflamatórias em geral com a estimulação da fase aguda por macrófagos ativados.

Pode-se observar que nos três tecidos (Figura 11) também houve estimulação da produção de TNF pelas células primárias que sofreram reestímulo cultivadas por 24h quando tratadas com as frações polissacarídicas SeRI<50 e SeSE<50, em linha com a sua associação com a IL-6. Apenas observando o perfil dos resultados das células cultivadas por 24h e das células frescas, pode-se perceber que, aparentemente, a liberação de TNF foi mais elevada nas células que sofreram reestímulo, tanto para o baço como para o intestino e sangue. Além disso, tanto no baço como no sangue, ambas as frações polissacarídicas SeRI<50 e SeSE<50 estimularam a produção de TNF quando comparadas com o controle negativo, mostrando um perfil mais pró-inflamatório dessas frações nesses tecidos.

No caso da produção de IL-10, nota-se que esta ocorreu tanto no baço como no sangue e no intestino. Para o baço e para o sangue, as células cultivadas por 24h tiveram uma maior liberação dessa citocina, entretanto, apenas para o primeiro os tratamentos com SeRI<50 e SeSE<50 foram significativamente maiores que o controle negativo (CN).

Tem sido observado que a IL-10 é relacionada com a supressão, tolerância imunológica e remissão de doenças (KAMANAKA et al, 2006). Camundongos com imunodeficiência induzidos a uma colite tiveram supressão da doença quando na presença de IL-10, visto que essa foi importante na regulação das células T, sendo,

assim, um importante regulador da inflamação intestinal (ASSEMAN et al, 1999). Apesar da IL-10 estar muito relacionada com o intestino, pode-se observar que sua liberação, tanto pelas células primárias que sofreram reestímulo cultivadas por 24h como pelas células frescas, foi baixa quando comparada com o baço e com o sangue. A produção de interleucina 10 pelas células ocorreu, provavelmente, como parte do mecanismo de controle do organismo para prevenir dos efeitos deletérios da cascata inflamatória (KIM et al, 2011), com intuito de atenuar o efeito do estímulo causado pelas frações isoladas (SeRI<50 e SeSE<50), visto que elas têm uma tendência a um perfil mais pró-inflamatório com base nas outras citocinas estimuladas.

Avaliando a quimiocina MCP-1 no baço, no intestino e no sangue, nota-se que entre as células frescas e as células reestimuladas cultivadas por 24h, parece ter havido estímulo nas duas, mas, aparentemente, o efeito foi mais marcante nas células obtidas do sangue e cultivadas com os polissacarídeos por 24h. O MCP-1 é uma quimiocina que tem o papel de regular a infiltração dos macrófagos e monócitos, bem como regular sua migração através dos tecidos (DESHMANE et al, 2009), sendo utilizado no tratamento de várias doenças.

Sua liberação observada, principalmente, no sangue, induzida pelas frações isoladas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50) pode ser devido ao fato de que no sangue há grande presença de monócitos, e estes são responsáveis por vigiar o sistema imune e a resposta inflamatória, através de sua migração pela corrente sanguínea (DESHMANE et al, 2009).

A citocina INF- γ faz parte da imunidade inata e da linha de defesa contra infecções (SADLER; WILLIAMS, 2008) e tem propriedades imunorreguladoras. Ela tem poder anti-viral e anti-proliferativo e sua produção pelas células do intestino está associada à regulação das propriedades secretoras e absorptivas, inclusive da secreção de imunoglobulinas (QUIDING et al, 1991). Avaliando a liberação da citocina INF- γ pelas células, os tratamentos com SeRI<50 e SeSE<50 estimularam mais aquelas que foram reestimuladas com as frações cultivadas por 24h, tanto no baço como no sangue. Já no intestino, aparentemente, não foi observada nenhuma resposta a esses tratamentos (SeRI<50 e SeSE<50).

A IL-12 é uma citocina produzida pelos monócitos ou macrófagos e sua produção pode estimular a atividade citolítica e a proliferação de células T, além de induzir a secreção da citocina INF- γ ; entre outras funções com poder imunomodulador (BRUNDA, 1994). Apesar de não haver diferença significativa, aparentemente houve estimulação dessa citocina no baço, no sangue e no intestino delgado, tanto pelas células frescas como pelas células reestimuladas por 24h, além disso, parece que os animais tratados com a fração SeSE<50 estimulou mais sua liberação no baço e no intestino do que a fração SeRI<50. Já no sangue, ambas as frações SeRI<50 e SeSE<50 estimularam a liberação de IL-12. Como a IL-12 pode estimular a liberação de INF- γ , essa influência pôde ser observada principalmente no sangue com os tratamentos das frações.

5.6.3. Efeito das frações SeRI<50 e SeSE<50 na produção de marcadores de superfície celular

Os linfócitos são um tipo de glóbulos brancos importantes para defender o organismo. Os linfócitos grandes e granulares são chamados de natural killers (células NK) e os linfócitos pequenos são chamados de linfócitos T ou B. Eles são, principalmente, produzidos na medula óssea, assim como no baço e placa de Peyer. (TIZARD, 1998). Na figura 12 pode-se observar a análise das populações linfocitárias representadas na forma de porcentagem dos marcadores de ativação de linfócitos T (CD3, CD4, CD8 e CD45, sendo este último utilizado para identificação da população linfocitária), de linfócitos B (CD19) e de porcentagem do marcador de monócito ativado (Ly6c), liberados pelas células mononucleares do baço, do sangue e do intestino delgado dos camundongos de linhagem balb/c coletadas logo após a eutanásia (células frescas) e daquelas mantidas em cultura de células primárias por 24h que foram reestimuladas com as frações SeSE<50 ou SeRI<50.

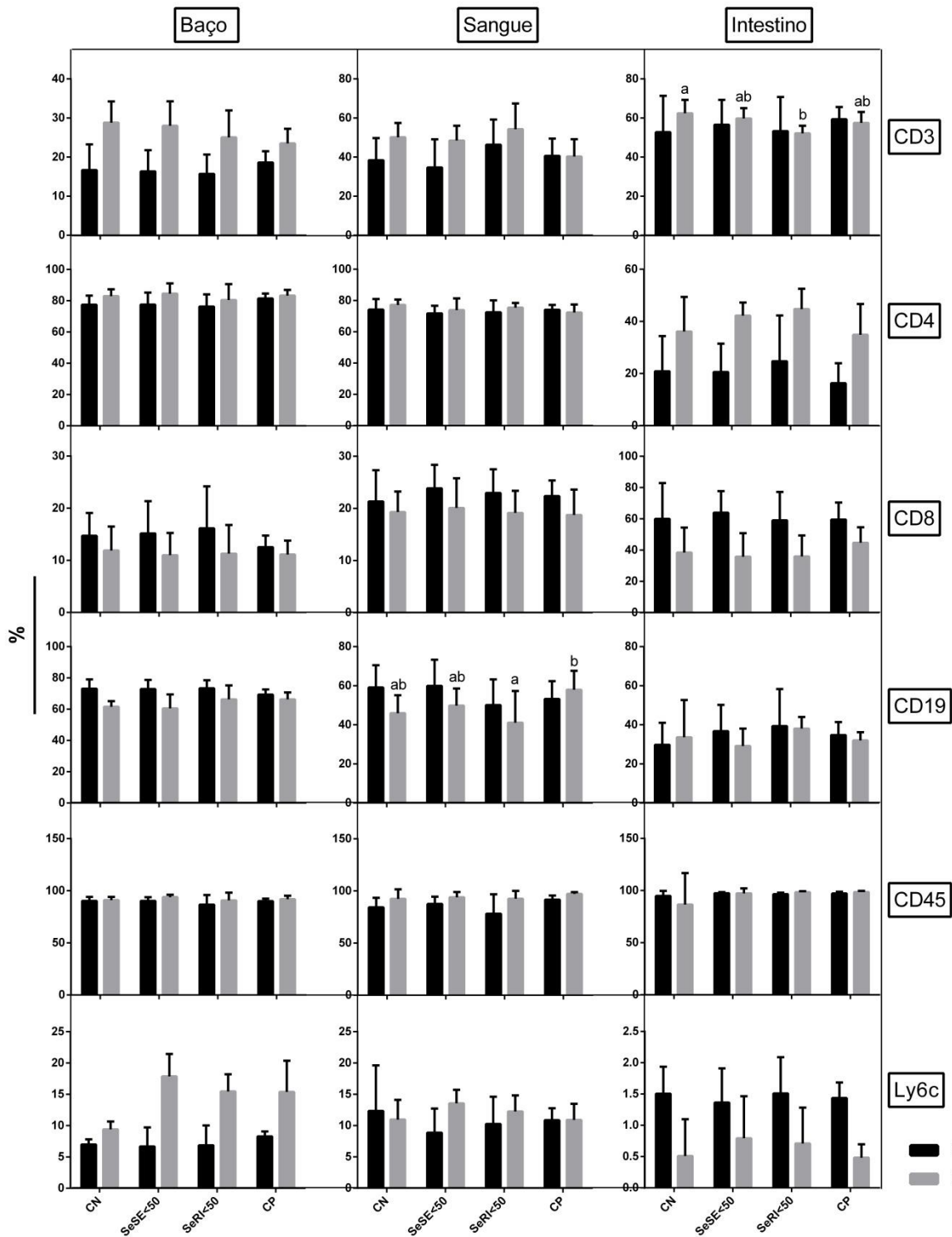


Figura 12- Marcadores de ativação de linfócitos T (CD3, CD4, CD8 e CD45) e B (CD19) e de marcador de monócitos ativados (Ly6c) produzidos pelas células mononucleares do baço, sangue e intestino delgado de camundongos balb/c coletados logo após a eutanásia (células frescas) e após 24h da cultura de células primárias que sofreram reestímulo com as frações SeSE<50 ou SeRI<50. Os animais foram previamente tratados com: água isenta de

endotoxinas (Controle Negativo – CN); fração polissacarídica isolada extraída do sobrenadante do tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeSE<50); fração polissacarídica isolada extraída do resíduo insolúvel após tratamento enzimático para retirada do amido com peso molecular menor que 50 kDa (SeRI<50); e Pululano (Controle Positivo – CP). Para o ensaio de reestímulo, parte das células mononucleares isoladas logo após a eutanásia (células frescas) do baço, sangue e intestino delgado de camundongos balb/c foram mantidas em cultura primária por 24h na presença dos controles, CN e CP e das frações polissacarídicas isoladas SeSE<50 e SeRI<50. Os resultados foram apresentados em forma de porcentagem. As letras (a, b) indicam diferença estatística entre os tratamentos de cada amostra de células nos diferentes tecidos para cada marcador, utilizando o teste de Tuckey ($p < 0,01$), sendo que apenas para o Ly6c de 24h foi $p < 0,1$. Caracteres omitidos indicam que as médias não diferiram estatisticamente entre si. Barras verticais indicam desvio padrão da média.

Os linfócitos T com expressão CD3 regulam a imunidade celular e fazem a transmissão de sinal de ativação para o citoplasma das células T. Sua porcentagem foi, aparentemente, alta nas células cultivadas por 24h que sofreram reestímulo tanto para o baço quanto para o sangue. Já no intestino delgado, a proporção de linfócitos CD3 foi significativamente menor para o tratamento com a fração SeRI<50 em relação ao controle branco para as mesmas células, enquanto que o tratamento com a fração SeSE<50 não apresentou diferença significativa.

Os linfócitos T com expressão CD4 e CD8 constituem uma subpopulação da população do linfócito T CD3 e foram também investigados no experimento. No baço e no sangue foram observadas porcentagens menores dos linfócitos T com marcadores de ativação CD8 do que a encontrada no intestino delgado, porém, não havendo diferença significativa entre os tratamentos, sendo, aparentemente, maior nas células monoclonais isoladas logo após a eutanásia (células frescas) do que nas células reestimuladas por 24h. No intestino delgado, observou-se maior porcentagem dessa subpopulação de linfócitos quando tratadas as células isoladas logo após a eutanásia (células frescas) com as frações polissacarídicas do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50), além de apresentarem uma porcentagem mais elevada do que nos outros tecidos. O linfócito T CD8 é uma célula T com poder citotóxico / supressor, servindo para destruir as células infectadas através de apoptose celular (morte celular programada). Esse resultado sugere que as frações SeRI<50 e SeSE<50 foram mais eficientes em ativar a subpopulação CD8 no intestino, podendo ser um estimulador para a destruição de células infectadas. Além disso, observa-se uma relação entre o resultado encontrado

para as espécies reativas de oxigênio (Figura 8) e o encontrado para a citocina TNF (Figura 11) induzidas pelas frações polissacarídicas em estudo com o observado nesta análise.

A porcentagem do linfócito T CD4 foi, aparentemente, maior para o baço e para o sangue, apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos. No intestino, as células cultivadas por 24h que sofreram reestímulo apresentaram valores mais elevados para os tratamentos utilizando as frações polissacarídicas SeSE<50 e SeRI<50. O linfócito T com expressão CD4 é uma célula T auxiliar / indutor, que libera mediadores químicos e assim recrutam outros tipos de células que vão agir de uma forma mais direta, ativando a cascata imune. Os linfócitos T auxiliares (Th1) produzem citocinas como IL-2, TNF, INF- γ , IL-12, desempenhando a ativação de outros linfócitos T, B e de outras células que participam induzindo a inflamação. Além disso, os linfócitos T auxiliares (Th2) produzem citocinas como a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, ativando, principalmente, os linfócitos B. (GONÇALVES, 1994; SATO et al, 2000; ERCOLE et al, 2003). Pode-se inferir que os tratamentos utilizando as frações SeRI<50 e SeSE<50 podem exercer efeito sobre a cascata imunológica.

Observando o perfil de linfócitos B, indicados pelo CD19, nota-se que as células isoladas logo após a eutanásia (células frescas) e as células cultivadas por 24h que sofreram reestímulo não foram muito diferentes, mas as primeiras, aparentemente, apresentaram valores maiores. Os linfócitos CD19 participam da imunidade humoral, e apresentam imunoglobulinas (receptores), que fazem o controle de sua sinalização, localizadas na membrana celular que se ligam a antígenos específicos ativando linfócitos e, assim, induzindo a produção de anticorpos (MOREIRA, 2014; LEBIEN; TEDDER, 2008; MESQUITA et al, 2010).

O marcador de monócitos ativados Ly6c apresentou porcentagem menor no intestino delgado do que no baço e no sangue. Nesses últimos, aparentemente as células cultivadas por 24h com reestímulo apresentaram-se maiores, enquanto que no intestino foi observado o contrário em todos os tratamentos. Apesar de não haver diferença significativa, os tratamentos com as frações SeRI<50 e SeSE<50 mostraram porcentagens mais elevadas no baço e no sangue nas células que foram reestimuladas por 24h. Uma vez que o aumento da ativação de monócitos indicado por Ly6c está

relacionado ao começo e à continuação do processo inflamatório (PEIXOTO, 2015), e o aumento deste pode vir acompanhado de maior liberação de INF- γ , já que ele é seu principal produtor (LEE et al, 2008), pode-se perceber que os tratamentos utilizando as frações isoladas do polissacarídeo do chuchu (SeRI<50 e SeSE<50), apesar de não ser estatisticamente significativo, tanto no baço como no sangue, parece relacionar o aumento de Ly6c e de INF- γ (Figura 11), pois ambos foram estimulados pelos tratamentos com SeRI<50 e SeSE<50.

É a partir do CD45 que podemos fazer a identificação da população de linfócitos, tendo mais confiabilidade na identificação dos outros marcadores de ativação de linfócitos. O CD45 é uma glicoproteína que está localizada na superfície de células hematopoiéticas nucleares (BENEVIDES, 2003), as quais nunca foram apresentadas à antígenos, participando para dar auxílio na ativação imunológica (ERCOLE et al, 2003).

As frações polissacarídicas extraídas do chuchu isoladas com menor peso molecular mostraram que podem promover efeito imunomodulador em células de macrófagos e em camundongos por meio de indução de espécies reativas, de citocinas e de produção linfocitária sem apresentar citotoxicidade. Além disso, a composição dessas frações também estão relacionada com a promoção de atividade imunomoduladora.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento por meio da filtração tangencial foi eficiente em gerar as amostras do presente estudo, SeRI<50 e SeSE<50, e sua caracterização permite sugerir que ambas as frações são formadas por galacturonanos, arabinanos, arabinogalactanos e glicomananos. A SeRI<50 é menos ramificada e, provavelmente, composta por galactanos, já a SeSE<50 é mais ramificada e, provavelmente, composta por galactuglucomananos.

Essas frações de baixo peso molecular foram capazes de estimular os macrófagos murinos RAW 264.7 e células mononucleares do baço, do sangue e do intestino delgado de camundongos balb/c, sugerindo um perfil mais pró-inflamatório, com base nos efeitos produzidos pelas espécies reativas, citocinas e pelos marcadores

de ativação de linfócitos. Ambas as amostras, SeRI<50 e SeSE<50, mostraram ser eficientes em ativar a cascata imunológica, não sendo citotóxicas mesmo quando empregadas nos ensaios em elevadas concentrações, tanto *in vitro* como *in vivo*. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, seria oportuno observar se os efeitos das moléculas ativas com poder imunológico de baixo peso molecular das frações isoladas do polissacarídeo do chuchu poderiam ser observados também por ensaio *in vivo* de fase crônica, para compreender melhor seu potencial imunomodulador e, eventualmente, a contribuição para a promoção da saúde.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. *Cellular and molecular immunology*. 5a ed. São Paulo: Elsevier, 562 p., 2005.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier / Medicina Nacionais, 2015. 552 p.
- AMARAL, L. I. V.; GASPARG, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea*, 34(4): 425-431, 2007.
- ASSEMAN, C.; MAUZE, S.; LEACH, M. W.; COFFMAN, R. L.; POWRIE, F. An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *J. Exp. Med.* Volume 190, Number 7, October 4, 995–1003, 1999.
- AUNG, L. H.; BALL, A.; KUSHADD, M. Developmental and nutritional aspects of Chayote (*Sechium edule*. Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44, 157–164, 1990.
- BAI, L.; ZHU, L.-Y.; YANG, B.-S.; SHI, L.-J.; LIU, Y.; JIANG, A.-M.; ZHAO, L.-L.; SONG, G.; LIU, T. -F. Antitumor and immunomodulating activity of a polysaccharide from *Sophora flavescens* Ait. *Int. J. Biol. Macromol.*, 51, 705–709, 2012.
- BENEVIDES, P. A. A. B. Efeito da mobilização com *G-CSF* nos linfócitos e células NK dos enxertos hematopoiéticos. Porto, 2003.
- BERNT, F. S.; BERGMAYER, H. U. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Bergmeyer, H. U., Ed.; *Academic Press: New York*, 1974; Vol. 3, 1974.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. of Bioch. and Bioph.*, v.303, n.2, 1993.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, Elmsford, v. 40, p. 845-859, 2004.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr., Campinas*, 12(2): 123-130, maio/ago., 1999.
- BLACKWOOD, A. D.; SALTER, J.; DETTMAR, P. W.; CHAPLIN, M. F. Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. *The journal of the royal society for the promotion of health*, v.120, n.4, 2000.
- BRITO, M.S.; OLIVEIRA, C. F. S.; SILVA, T.; R. G.; LIMA, R. B.; MORAIS, S. N.; SILVA, J. H. V. Polissacarídeos Não Amiláceos Na Nutrição De Monogástricos – Revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, n.4, p.111-117, 2008.
- BRUNDA, M. J. Interleukin-12. *Journal of leukocyte biology*, v55, Feb., 1994.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, v.344, p.1879-1900, 2009.

CARPITA, N. C.; SHEA, E. M. (1989) Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates: analysis of carbohydrates by GLC and MS. In Analysis of Carbohydrates by GLC and MS; Biermann C.J.; McGinnis G.D., Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton: 157-216.

CASTRO-ALVES, V. C.; NASCIMENTO, J. R. O. Polysaccharides from raw and cooked chayote modulate macrophage function. *Food Research International*, 81, 171–179, 2016.

CASTRO-ALVES, V. C.; SHIGA, T.M.; NASCIMENTO, J. R. O. Polysaccharides from chayote enhance lipid efflux and regulate NLRP3 inflammasome priming in macrophage-like THP-1 cells exposed to cholesterol crystals. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 502–510, 2019.

CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. *Biomed and pharmacother*, 48, 445-453, 1994.

CHÁVEZ-SÁNCHEZ, L.; ESPINOSA-LUNA, J. E.; CHÁVEZ-RUEDA, K.; LEGORRETA-HAQUET, M. V.; MONTOYA-DÍAZ, E.; BLANCO-FAVELA, F. Innate immune system cells in atherosclerosis. *Archives of Medical Research*, 45(1), 1–14, 2014.

CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*, may, vol 296, 2002.

CHEN, H.; ZHANG, M.; QU, Z.; XIE, B. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). *Food Chemistry*, 106, 559–563, 2008.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 48, p. 749-762, 2010.

CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 43, n. 2, p. 347-351, 1995.

CURRIER, N. L.; LEJTENYI, D.; MILLER, S. C. Effect over time of *in-vivo* administration of the polysaccharide arabinogalactan on immune and hemopoietic cell lineages in murine spleen and bone marrow. *Phytomedicine*, 10: 145–153, 2003.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of interferon & cytokine research*. Volume 29, Number 6, 2009.

DU, Y.; LIU, Y.; WANG, J. Polysaccharides from *Umbilicaria esculenta* cultivated in Huangshan Mountain and immunomodulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1272–1276, 2015.

EDER, K.; BAFFY, N.; FALUS, A.; FULOP, A. K. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm. Res.*, 58:727–736, 2009.

- ELLEUCH, M.; BEDIGIAN, D.; ROISEUX, O.; BESBES, S.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124, 411–421, 2011.
- ERCOLE, L. P.; MALVEZZI, M.; BOARETTI, A. C.; UTIYAMA, S. R. R.; RACHID, A.; RADOMINSKI, S. C. Análise imunofenotípica de subpopulações linfocitárias do sangue periférico na esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol*, v. 43, n. 3. p. 141-8, mai./iun, 2003.
- FABBRI, M.; SMART, C.; PARDI, R. T lymphocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 1004–1008, 2003.
- FAO/WHO. Draft codex standard for chayotes. In: FAO/WHO (ed) Joint FAO/WHO foodstandards programme codex alimentarius comission: twenty-third session, 1 st. Rome, pp 44–49, 1999.
- FARIA, B. A.; SILVA, S. M.; ABREU, M. T. C. L.; NAPIMOGA, M. H. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantados. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 30(4):309-315, 2008.
- FARINAS, C.S. A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.
- FAUZININGTYAS, R.; RISTANTO, A. C. A.; MAKHFUDLI. Effectiveness of Consumption *Sechium Edule* on Decreasing Blood Pressure in Elderly with Hypertension in Coastal Area. *Earth and Environmental Science*, 519, 2020.
- FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, p. 248-253, 1998.
- GIBEAUT, DM & CARPITA, NC (1991) Clean-up procedure for partially methylated alditol acetate derivatives of polysaccharides. *J. Chromatogr.* 587, 284–287.
- GONÇALVES, L. F. S. Efeito do anticorpo monoclonal anti-cd3 no infiltrado inflamatório intra-exerto em transplantados renais. Porto alegre, 1994.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Á.; MASTACHE, E. F.; ABALDE, S. L. Linfocitos T y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales. *Medicine*, 9(33): 2162-2173, 2005.
- GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, v. 111, n. 7, p. 927-930, 2002.
- HACHIMURA, S.; TOTSUKA, M.; HOSONO, A. Immunomodulation by food: impact on gut immunity and immune cell function. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 82, n. 4, p. 584-599, 2018.
- HARM, S.; GABOR, F.; HARTMANN, J. Low-dose polymyxin: an option for therapy of Gram-negative sepsis. *Innate immunity*, v. 22, n. 4, p. 274-283, 2016.
- HERNANDEZ-URIBE, J. P.; AGAMA-ACEVEDO, E.; GONZALEZ-SOTO, R. A.; BELLO-PÉREZ, L. A.; VARGAS-TORRES, A. Isolation and characterization of Mexican chayote tuber (*Sechium edule* Sw.) starch. *Starch/Starke*, 63, 32–41, 2011.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336(6086), 1268–1273, 2012.

HU, D. J.; CHEONG, K. L.; ZHAO, J.; LI, S. P. Chromatography in characterization of polysaccharides from medicinal plants and fungi. *Journal of Separation Science*, 36 (1), 1–19, 2013.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 31, n. 1, p. 9-17, 2002.

JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, J.; SALAZAR-MONTOYA, J. A.; RAMOS-RAMÍREZ, E. G. Physical, chemical and microscopic characterization of a new starch from chayote (*Sechium edule*) tuber and its comparison with potato and maize starches. *Carbohydrate Polymers*, 68, 679–686, 2007.

JO, H. Y.; KIM, Y.; PARK, H. W.; MOON, H. E.; BAE, S.; KIM, J. W.; KIM, D. G.; PAEK, S. H. The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. *Exp. Neurobiol.*, v. 24, n. 3, p. 235-245, 2015.

KACZMARCZYKA, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer metabolism clinical and experimental, 61, 1058 – 1066, 2012.

KAMANAKA, M.; KIM, S. T.; WAN, Y. Y.; SUTTERWALA, F. S.; LARA-TEJERO, M.; GALA'N, J. E.; HARHAJ, E.; FLAVELL, R. A. Expression of Interleukin-10 in Intestinal Lymphocytes Detected by an Interleukin-10 Reporter Knockin tiger Mouse. *Immunity* 25, 941–952, December 2006.

KEEGSTRA, K. Plant cell walls. *Plant Physiology*, v.154, p.483-486, 2010.

KIM, J. B.; CARPITA, N. C. Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiol.*, v. 98, p. 646-653, 1992.

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.

KNIGHT, J. A. Review: Free Radicals, Antioxidants, and the Immune System. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 30, n. 2, 2000.

KOLEY, D.; BARD, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 39, p. 16783-16787, 2010.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D. M. An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, v. 64, p. 313-320, 1983.

LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, September, v.112, n.5, 2008.

LEE S. J.; RIM, H. K.; JUNG, J. Y.; AN, H. J.; SHIN, J. S.; CHO, C. W.; RHEE, Y. K.; HONG, H. D.; LEE, K. T. Immunostimulatory activity of polysaccharides from Cheonggukjang, *Food Chem. Toxicol.*, 59, 476–484, 2013.

LEE, P. Y.; WEINSTEIN, J. S.; NACIONALES, D. C.; SCUMPIA, P. O.; LI, Y.; BUTFILOSKI, E.; ROOIJEN, N.; MOLDAWER, L.; SATOH, M.; REEVES, W. H. A Novel Type I Interferon-producing Cell Subset in Murine Lupus. *J Immunol.*, April 1; 180(7): 5101–5108, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Principios de bioquímica*. 4a. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2006.

LEI, W. et al. Immuno-stimulatory activity of a polysaccharide-enriched fraction of *Sutherlandia frutescens* occurs by the toll-like receptor-4 signaling pathway. *Journal of ethnopharmacology*, v. 172, p. 247-253, 2015.

LEMAIRE, S. et al. Study of macrophage functions in murine J774 cells and human activated THP-1 cells exposed to oritavancin, a lipoglycopeptide with high cellular accumulation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 58, n. 4, p. 2059-2066, 2014.

LEUNG, M. Y. K. et al. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology letters*, v. 105, n. 2, p. 101-114, 2006.

LI, C.; HUANG, Q.; FU, X.; YUE, X.; LIU, R. H.; YOU, L. Characterization, antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 298–305, 2015.

LI, J.; NIE, S.; XIE, M.; LI, C. Isolation and partial characterization of a neutral polysaccharide from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru and its antioxidant and immunomodulatory activities. *Journal of Functional Foods*, 6, 410 – 418, 2014.

LI, W. J.; LI, L.; ZHEN, W. Y.; WANG, L. F.; PAN, M.; LV, J. Q.; WANG, F.; YAO, Y. F.; NIE, S. P.; XIE, M. Y. Ganoderma atrum polysaccharide ameliorates ROS generation and apoptosis in spleen and thymus of immunosuppressed mice. *Food and Chemical Toxicology*, 99, p. 199-208, 2017.

LIU, W.; WANG, H.; YU, J.; LIU, Y.; LU, W.; CHAI, Y.; LIU, C.; PAN, C.; YAO, W.; GAO, X. Structure, chain conformation, and immunomodulatory activity of the polysaccharide purified from *Bacillus Calmette Guerin* formulation. *Carbohydrate Polymers*, 150, 149–158, 2016.

LOMBARDO-EARL, G.; ROMAN-RAMOS, R. ZAMILPA, A.; HERRERA-RUIZ, M.; ROSAS-SALGADO, G.; TORTORIELLO, J.; JIMÉNEZ-FERRER, E. Extracts and Fractions from Edible Roots of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. with Antihypertensive Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

LUND, M. E. et al. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of immunological methods*, v. 430, p. 64-70, 2016.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F.; KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Basel, v. 60, p. 2334-2346, 2003.

- MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophage: an immunologic functional perspective. *The Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 27, p. 451-483, 2009.
- MENG, L.; FENG, K.; WANG, L.; CHEONG, K.; NIE, H.; ZHAO, J.; LI, S. Activation of mouse macrophages and dendritic cells induced by polysaccharides from a novel *Cordyceps sinensis* fungus UM01. *Journal of Functional Foods*, 9, 242–253, 2014.
- MESQUITA, D. J.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B *Rev Bras Reumatol*, 50(5):552-80, 2010.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.
- MOREIRA, C. Linfócitos. *Revista de ciência elementar*, v2(01):091, 2014.
- MORGAN, D. M. L. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Polyamine protocols*, p. 179-184, 1998.
- MUDGIL, D.; Barak, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review *International Journal of Biological Macromolecules*. 61, 1– 6, 2013.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.*, 417, p. 1-13, 2009.
- NIKOLOVA, M.; AMBROZOVA, G.; KRATCHANOVA, M.; DENEV, P.; KUSSOVSKI, V.; CIZ, M.; LOJEK, A. Effects of Pectic Polysaccharides Isolated from Leek on the Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Phagocytes. *J Med Food* 00 (0), 1–8, 2013.
- NOUMEDEM, J. A. K.; MIHASAN, M.; LACMATA, S. T.; STEFAN, M.; KUIATE, J. R.; KUETE, V. Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- OCHOA-VILARREAL, M. et al. Plant cell wall polymers: Function, structure and biological activity of their derivatives. *In: GOMES, A. S. Polymerization*. [S.I.]. InTech, p.63-83, 2012.
- ORDÓÑEZ, A. A. L.; GOMEZ, J. D.; CUDMANI, N.; VATTUONE, M.; ISLA, M. I. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. Microbial ecology in health and disease. *Food Chemistry*, v.80, p. 33–39, 2003.
- PALANISAMY, V.; BALAKRISHNAN, S. Human red blood cell membrane stability testing for the estimation of anti-inflammatory activity and anti bacterial activity of three different of extract of *sechium edule* fruits. *Pharmacie Globale, (IJCP) 02 (03)*, 2016.
- PEIXOTO, T. V. Aumento de células TCD4+CD69+ e redução de células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+ em camundongos com Lúpus eritematoso sistêmico (LES) induzido por pristane. São Paulo, 2015.

- PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURAO, P. A. S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology*, Cary, v. 12, n. 10, p. 573-580, 2002.
- PERES, C. M.; CURI, R. Como cultivar células. *In: Como cultivar células*. Guanabara Koogan, 2005.
- QUIDING, M.; NORDSTROM, I.; KILANDER, A. ; ANDERSSON, G.; HANSON, L. A.; HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Oral Cholera Vaccination Induces Strong Intestinal Antibody Responses and Interferon- γ Production and Evokes Local Immunological Memory. *Intestinal Immune Responses in Humans*. V. 88, July, 143-148, 1991.
- REILLY, T. P. et al. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochemical pharmacology*, v. 55, n. 6, p. 803-810, 1998.
- SAADE, R. L. Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Rome, Italy: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, 1996.
- SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews immunology*, v.8, july, 2008.
- SALAZAR-AGUILAR, S.; RUIZ-POSADAS, L. M.; CADENA-IÑIGUEZ, J.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; SANTIAGO-OSORIO, E.; AGUIÑIGA-SÁNCHEZ, I.; RIVERA-MARTÍNEZ, A. R.; Aguirre-Medina, J. F. *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, a New Cultivar with Antiproliferative Potential in a Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *Nutrients*, 9, 798, 2017.
- SATO, S.; HASEGAWA, M.; FUJIMOTO, M.; TEDDER, T. F.; TAKEHARA, K. Quantitative Genetic Variation in CD19 Expression Correlates with Autoimmunity. *J Immunol*,; 165:6635-6643, 2000.
- SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, v.61, p.263-289, 2010.
- SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, 6(3), 317–333, 2006.
- SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; BOVO, F.; STEVAN-HANCKE, F. R.; MAURER, J. B. B.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.1, p.201-214, 2016.
- SHERIDAN, B. S.; LEFRANCOIS, L. Isolation of mouse lymphocytes from small intestine tissues. *Curr Protoc Immunol*. v. 3, 2012.
- SHIGA, T. M.; SOARES, C. A.; NASCIMENTO, J. R. O.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. 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.*, 91:1511-6, 2011.
- SHIGA, TM, PERONI-OKITA, FHG, CARPITA, NC, LAJOLO, FM & CORDENUNSI, BR (2015) Polysaccharide composition of raw and cooked chayote (*Sechium edule* Sw.) fruits and tuberous roots. *Carbohydr. Polym.* 130, 155–165.

SHIGA, TM; CARPITA, NC; LAJOLO, FM; CORDENUNSI-LYSENKO, BR (2017) Two banana cultivars differ in composition of potentially immunomodulatory mannan and arabinogalactan. *Carbohydrate Polymers*, 164, 31–41.

SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, v. 5, p. 415-418, 2000.

SLAVIN, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*, 5, 1417-1435, 2013.

SOKOLOVA, E. V.; SOLOV'EVA, T. F.; KIM, Y. H.; SHIN, K. S. Effects of structural peculiarities of carrageenans on their immunomodulatory and anticoagulant activities. *Carbohydrate Polymers*, 87, 713– 720, 2012.

STIMPEL, M.; PROKSCH, A.; WAGNER, H.; LOHMANN-MATTHES, M. -L. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infection and Immunity*, Washington, v. 46, n.3, p.845-849, 1984.

STUART, R. W.; LEFKOWITZ, D. L.; LINCOLN, J. A.; HOWARD, K.; GELDERMAN, M. P.; LEFKOWITZ, S. S. Upregulation of phagocytosis and candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant, acemannan. *Int. J. Immunopharmac.*, Vol. 19, No. 2, pp. 75-82, 1997.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v. 140, p. 805–820, 2010.

TAN, Y. -F.; LI, H. -L.; LAI, W. -Y.; ZHANG, J. -Q. Crude dietary polysaccharide fraction isolated from jackfruit enhances immune system activity in mice. *Journal of Medicinal Food*, 16(7), 663–668, 2013.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* n. 279, p. 1005-1028, 2000.

TUNGLAND. B. C.; MEYER D. Nondigestible Oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, Vol. 3, 2002.

USDA. USDA national nutrient database for standard reference. National Nutrient Database for Standard Reference. Release 28 slightly revised May, 2016, from <https://ndb.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170402/nutrients>. 2020.

VISTICA, D. T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*, v. 51, n. 10, p. 2515-2520, 1991.

WANG, Z.; LUO, D. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum Makino*. *Carbohydrate Polymers*, 68, 54–58, 2007.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, p. 369-376, 2005.

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

WU, D. T.; MENG, L. Z.; WANG, L. Y.; LV, G. P.; CHEONG, K. L.; HU, D. J.; GUAN, J.; ZHAO, J.; LI, S. P. Chain conformation and immunomodulatory activity of a hyperbranched polysaccharide from *Cordyceps sinensis*. *Carbohydrate Polymers*, 110, 405–414, 2014.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. *Nature*, 496 (7446), 445–455, 2013.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X.; ACHONG, M. IL-6 Is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses. *J. Clin. Invest.* V.101, N 2, January, 311–320, 1998.

YAMADA, H.; NAGAI, T.; CYONG, J. –C.; OTSUKA, Y.; TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; SHIMADA, K. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 144, p. 101-111, 1985.

YANG, L. C.; LU, T. J.; HSIEH, C. C.; LIN, W. C. Characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides derived from *Dendrobium tosaense*. *Carbohydrate Polymers*, 111, 856–863, 2014.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry*, v. 111, p. 428-432, 2008.

YERMAK, I. M.; BARABANOVA, A. O.; AMININ, D. L.; DAVYDOVA, V. N.; SOKOLOVA, E. V.; SOLOV'EVA, T. F.; KIM, Y. H.; SHIN, K. S. Effects of structural peculiarities of carrageenans on their immunomodulatory and anticoagulant activities. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 713-720, 2012.

YU, Q.; NIE, S. P.; LI, W. J.; ZHENG, W. Y.; YIN, P. F.; GONG, D. M.; XIE, M. Y. Macrophage immunomodulatory activity of a purified polysaccharide isolated from *Ganoderma atrum*. *Phytotherapy Research*, v. 27, p. 186-191, 2013.

ZHANG, L. et al. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in caco-2 cells. *The Journal of nutrition*, v. 135, n. 7, p. 1752-1756, 2005.

ANEXOS

Anexo I – Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), autorizando o experimento em camundongos



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



CEUA/FCF 003.2019-P584

CERTIFICADO

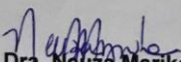
Certificamos que a proposta intitulada **Isolamento, Purificação e Caracterização das Frações de Diferentes Pesos Moleculares de Polissacarídeos Extraídos do Chuchu (*Sechium edule*) com Potencial Biológico em Células THP-1**, registrada com o nº **584**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Mayra Crystiane de Aragão Batista**, sob orientação do **Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **08 de fevereiro de 2019**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/02/2019 a 30/09/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Isogênico– BALB/c
Número de animais	56
Sexo	Macho
Peso/Idade	6 a 8 semanas – 21g
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina da USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

Ressaltamos que após o período de término do projeto de pesquisa, nenhum ensaio poderá ser realizado.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2019.


Profa. Dra. Neiza Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora CEUA/FCF/USP

Anexo II – Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), autorizando o experimento em camundongos, com alteração do prazo de autorização (prorrogação)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Ofício CEUA/FCF 067.2019

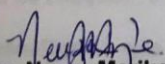
São Paulo, 30 de setembro de 2019.

Prezada Senhora,

Informo que foi **APROVADO** “ad referendum” da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), nesta data, a alteração proposta para o projeto de pesquisa **“Isolamento, Purificação e Caracterização das Frações de Diferentes Pesos Moleculares de Polissacarídeos Extraídos do Chuchu (Sechium edule) com Potencial Biológico em Células THP-1”** (Protocolo CEUA nº 584), conforme constante no documento apresentado:

- **Prorrogação de prazo por mais 6 meses (30/03/2020).**

Atenciosamente,


Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimoto
Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Ilma. Sra.
Pesquisadora: Mayra Crystiane de Aragão Batista
Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
FBA/FCF/USP