

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Fisiopatologia e Toxicologia

**Influência da Delfinidina como potencial  
modulador da capacidade imunorregulatória das  
Células-Tronco Mesenquimais**

Bruna Roberta Oliveira Neves

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo  
2021

Bruna Roberta Oliveira Neves

Influência da Delfinidina como potencial  
modulador da capacidade imunorregulatória das  
Células-Tronco Mesenquimais

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo  
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

N514i Neves, Bruna Roberta Oliveira  
Influência da Delfinidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória das Células Tronco Mesenquimais / Bruna Roberta Oliveira Neves. - São Paulo, 2021.  
62 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.  
Orientador: Fock, Ricardo Ambrosio

1. Célula-Tronco Mesenquimal. 2. Delfinidina. 3. Imunorregulação. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrosio, orientador.

Bruna Roberta Oliveira Neves

Influência da Delfinidina como potencial  
modulador da capacidade imunorregulatória das  
Células-Tronco Mesenquimais

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre em ciências

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock  
Orientador/Presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021

Dedico à minha Bisavó Helena, pelo apoio de todas as formas, mesmo não compreendendo o porquê de tanto eu precisar estudar tanto.

Em especial a minha cadela Flor que se foi nesse tempo, mas me permitiu aprender a viver, e a Amora, minha gata, que chegou nesse finalzinho do mestrado aliviando minha ansiedade. Aos amigos que escolhi como família (André Paulo, Carolina Coelho, Sumara, Lucas Falocci, Thais Godoy, Mariana Louzado, Maiara, Tatiane), vocês fizeram a diferença me ouvindo, me acalmando, me ajudando e entendendo minha ausência, me distraindo quando se fazia necessário para minha saúde mental.

E ao meu amigo e namorado, Renan pelo apoio no último ano.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Ricardo A. Fock, orientador deste trabalho, meus sinceros agradecimentos, pela confiança, profissionalismo, ensinamentos e por auxiliar na minha formação.

À Diretoria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), à Comissão de pós-graduação em farmácia (CPG) da FCF-USP, à Comissão coordenadora do programa (CCP) de pós graduação em fisiopatologia e toxicologia da FCF-USP e à secretaria do departamento de fisiopatologia e toxicologia da FCF-USP.

Às minhas amigas do laboratório de Hematologia experimental da FCF-USP, Gabriela Kodja, por ter sido meu suporte em muitos momentos além do lab., à Renaira Oliveira, Andressa Santos e Talita Santori pelos auxílios, suporte e guia no período inicial, com conhecimentos que somente a prática e a vivência delas na pesquisa poderiam me ajudar.

À Sumara de Freitas, que veio da graduação para pós-graduação, sendo minha parceira dos experimentos finais, me auxiliando em diversos momentos, inclusive meu ombro amigo quando se fazia necessário, sendo a pessoa que levo para a vida.

À Camille, doutoranda do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos com o Wersten Blot.

À Renata Alburquerque pelo auxílio com o citômetro de fluxo.

Ao Edson Makiyoma, técnico do laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pelo suporte técnico.

Bem como, ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

E ao processo 2018/25813-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

## RESUMO

Neves, B. R. O. **Influência da Delfinidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória das Células-Tronco Mesenquimais**. 2021. 62f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

As Células-Tronco Mesenquimais (CTMs), são células multipotentes, presentes em diversos tecidos, sendo bastante estudada devido sua capacidade imunorregulatória por meio da liberação de fatores solúveis. Fatores estes que atuam sobre as funções de células do sistema imunitário. Simultaneamente, estudos indicam que os compostos flavonoides, em destaque a Delfinidina, presente em alguns frutos e flores, possuem atuação anti-inflamatória e inibitória sobre células do sistema imunitário. Todavia, são escassos os estudos em relação entre a capacidade imunorregulatória da CTM e a influência da Delfinidina, sendo este o objetivo deste estudo. Inicialmente, a Delfinidina 3-O- $\beta$ -D-glicosídeo foi escolhido, devido a sua maior estabilidade e a dose de 50  $\mu$ M foi selecionada após análise por citometria de fluxo que mostrou aumento da fase proliferativa do ciclo celular. Posteriormente ao realizar análise da produção de fatores solúveis pelas CTM, os resultados mostraram aumento da produção de IL-10, TGF- $\beta$  e Oxido nítrico pelas CTM tratadas com Delfinidina. Bem como, diminuição da expressão de p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pelas CTMs tratadas com Delfinidina, quando avaliadas por Wersten Blot. Adicionalmente, para analisar a Delfinidina sobre os efeitos imunorregulatórios da CTM sob macrófagos (RAW 264.7), célula esta, importante no sistema imune inato. Foram realizadas culturas condicionadas, com posterior análise da produção de fatores solúveis, os resultados mostraram aumento da produção de IL-10, e diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-12 pelos macrófagos, nas culturas condicionadas. Assim como, diminuição da expressão do fator p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pelos macrófagos nas culturas condicionadas, quando avaliadas por Wersten Blot. Ademais, ao analisar a atividade metabólica dos macrófagos por ensaio de MTT, os resultados mostraram que as culturas condicionadas e a Delfinidina *per si* foi capaz de diminuir a atividade metabólica, sem alterar os efeitos anti-inflamatórios sobre a célula. Em síntese, a Delfinidina mostrou acentuar a atuação imunorregulatória da CTM sobre a linhagem macrofágica, célula esta, de grande importância para o sistema imune inato.

Palavras-chave: Célula-Tronco Mesenquimal; Delfinidina; Imunorregulação.

## **ABSTRACT**

Neves, B. R. O. **Influence of Delphinidin as a potential modulator of the immunoregulatory capacity of Mesenchymal Stem Cells**. 2021. 62f. Dissertation (Master's degree). Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2021.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are multipotent cells present in various tissues, being widely studied due to their immunoregulatory capacity through the release of soluble factors. These factors act on the functions of cells of the immune system. Simultaneously, studies indicate that flavonoid compounds, especially Delphinidin, present in some fruits and flowers, have anti-inflammatory and inhibitory effects on immune system cells. However, there are few studies on the relationship between the immunoregulatory capacity of MSC and the influence of Delphinidin, which is the objective of this study. Initially, Delphinidin 3-O- $\beta$ -D-glycoside was chosen due to its greater stability and the 50  $\mu$ M dose was selected after analysis by flow cytometry which showed an increase in the proliferative phase of the cell cycle. Subsequently, when analyzing the production of soluble factors by MSCs, the results showed an increase in the production of IL-10, TGF- $\beta$  and nitric oxide by MSCs treated with Delphinidin. As well as decreased expression of p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B by MSCs treated with Delphinidin, when evaluated by Western Blot. Additionally, to analyze Delphinidin on the immunoregulatory effects of MSC on macrophages (RAW 264.7), this cell is important in the innate immune system. Conditioned cultures were performed, with subsequent analysis of the production of soluble factors, the results showed an increase in the production of IL-10, and a decrease in the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  and IL-12 by macrophages, in the conditioned cultures. As well as decreased expression of p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B factor by macrophages in conditioned cultures, when evaluated by Western Blot. Furthermore, when analyzing the metabolic activity of macrophages by MTT assay, the results showed that conditioned cultures and Delphinidin itself was able to decrease the metabolic activity, without altering the anti-inflammatory effects on the cell. In summary, Delphinidin has shown to enhance the immunoregulatory action of MSC on the macrophage lineage, a cell that is of great importance for the innate immune system.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cell; Delphinidin; Immunoregulation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Esquematização da placa de cultivo com a célula Raw 264.7. ....	29
<b>Figura 2 -</b> Avaliação da Viabilidade Celular para Padronização da dose.....	31
<b>Figura 3 -</b> Avaliação do Ciclo Celular em histograma do grupo sem LPS. ....	32
<b>Figura 4 -</b> Avaliação do Ciclo Celular em histograma do grupo com LPS. ....	33

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Avaliação do Ciclo Celular do grupo sem LPS. ....	33
<b>Gráfico 2</b> - Avaliação do Ciclo Celular do grupo com LPS. ....	33
<b>Gráfico 3</b> – Resultado da produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6, (C) IL-10, (D) TGF- $\beta$ , (E) PGE2 e (F) NO pelas CTMs. ....	35
<b>Gráfico 4</b> - Resultado dos efeitos da Delfinidina na expressão de NF- $\kappa$ B e STAT-3 por CTMs. ....	36
<b>Gráfico 5</b> - Resultados dos efeitos do sobrenadante de CTMs e Delfinidina na viabilidade Raw 264.7 por ensaio de MTT. ....	37
<b>Gráfico 6</b> - Resultado da produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-12, (D) IL-10 pelas Raw 264.7. ....	38
<b>Gráfico 7</b> - Resultado dos efeitos do sobrenadante de CTMs e delfinidina na expressão de NF- $\kappa$ B E STAT-3 por Raw 264.7. ....	39

## **LISTA DE TABELAS**

Nenhuma entrada de índice de tabelas foi encontrada.

## LISTA DE ABREVIACOES

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CAMP1	Molécula de adesão 1
CCL	Ligante de quimiocina
CD	Cluster de diferenciao
<i>Col2a1</i>	Colágeno tipo II, alpha 1
COX	Cicloxigenase
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
DC	Células Dendríticas
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<i>FoFABP4</i>	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
GM-CSF	Fator de crescimento de colnias granulcítico
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon- gama
iNOS	óxido nítrico indutível
ISCT	<i>Internation Society of cellular therapy</i>
JAKs	<i>Janus quinases</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago perfil 1
M2	Macrófago perfil 2
MCP-1	Proteína monocítica quimiotática 1
M-CSF	Fator de crescimento de colnias macrofágicas
MDSC	Células supressoras derivadas de mieloide
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , complexo principal de histocompatibilidade

MO	Medula Óssea
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MyD88	Myeloid differentiation primery response gene 88
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	<i>Nod Like Receptors</i>
NO	Óxido nítrico
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
pD1	Programa de morte celular 1
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PGN	Peptídeoglicano
PI	Iodeto de Propídio
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamm</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> , Receptores de Reconhecimento de Padrões
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> , Transdutor de Sinais e Ativador de Transcrição 3
SREBP1	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Células T <i>helper</i> 1
Th2	Células T <i>helper</i> 2
Th17	Células T <i>helper</i> 17
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócitos T regulatório
TYK2	<i>Non-receptor tyrosine-protein kinase</i> , tirosina-proteína quinase não receptora
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

## Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	17
2.2 CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAIS: ASPECTOS FUNCIONAIS E IMUNORREGULATÓRIOS.....	18
2.3 DELFINIDINA.....	21
3. OBJETIVO GERAL .....	24
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1. CULTIVO DAS C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> T <sub>1/2</sub> .....	25
4.2. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	25
4.3. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	25
4.4. DOSAGEM DE FATORES SOLÚVEIS POR ELISA.....	26
4.5.1. SDS-PAGE E “WESTERN BLOTTING” .....	27
4.5.1.1. PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA.....	27
4.5.1.2. PREPARO DE LISADO DE PROTEÍNAS PARA SDS-PAGE E “WESTERN BLOTTING” .....	27
4.5.1.3. TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DO GEL PARA A MEMBRANA (NITROCELULOSE).....	27
4.5.1.4. SONDAGENS DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPOS.....	28
4.5.1.5. REVELAÇÃO COM SISTEMA QUIMIOLUMINESCENTE .....	28
4.6. CULTURA COM SOBRENADANTE DE CTM EM CÉLULAS RAW 264.7 .....	28
4.6.1. ENSAIO DE MTT PARA RAW 264.7 CULTIVADAS .....	29
4.6.2. DOSAGENS DE CITOCINAS PELAS RAW 264.7.....	30
4.6.3. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NF-KB (TOTAL E FOSFORILADO) E STAT 3 (TOTAL E FOSFORILADO) NAS RAW 264.7.....	30
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
5.0. RESULTADOS .....	31
5.1. EFEITO DA DELFINIDINA NA VIABILIDADE CELULAR EM CTMS PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE .....	31
5.2. EFEITO DA DELFINIDINA NO CICLO CELULAR EM CTMS.....	32
5.3. EFEITO DA DELFINIDINA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CTMS .....	34
5.4. EFEITO DA DELFINIDINA NA EXPRESSÃO DE NFκB E STAT-3 POR CTMS .....	35
5.5. EFEITO DO SOBRENADANTE DE CTMS E DELFINIDINA NA VIABILIDADE RAW 264.7 POR ENSAIO DE MTT .....	36

<b>5.6. EFEITO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS RAW 264.7 CULTIVADAS NA PRESENÇA DE SOBRENADANTE DE CTMS E DELFINIDINA .....</b>	<b>37</b>
<b>5.7. EFEITO DO SOBRENADANTE DE CTMS E DELFINIDINA NA EXPRESSÃO DE NF-KB E STAT-3 POR RAW 264.7 .....</b>	<b>39</b>
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIAS.....	47

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As Células-Tronco mesenquimais (CTMs) tem instigado cada vez mais interesse em função de sua capacidade terapêutica, que englobam: regulação da inflamação, reparo e homeostasia tecidual (WANG, *et al.*, 2014). Ainda no início do século, Nauta e colaboradores, já relatava que as CTMs, apresentam capacidade de modular a atividade de células imunes, bem como a liberação de fatores solúveis, como quimiocinas, citocinas, e fatores de crescimento. (NAUTA, *et al.*, 2006)

E com o avanço das pesquisas, atualmente se relata em diversos estudos, seus possíveis usos terapêuticos na imunoterapia com o intuito de restabelecer o equilíbrio da resposta imunológica, em doenças como, osteoartrite, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal e tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro, devido sua atuação imunorregulatória, e sua plasticidade em se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, tais como osteócitos, adipócitos e condrócitos. (HYUN, *et al* 2019; JIANG e XU, *et al.* 2020; KURODA, *et al.*, 2010; MENNAN, *et al.* 2019; RODRIGUEZ, *et al.* 2019; WANG, *et al.*, 2012)

Semelhantemente, compostos alimentares bioativos, possuem a capacidade de provocar efeitos nas atividades biológicas, por meio de interação dieta-gene, que atua sobre mecanismos complexos à níveis celulares e moleculares, incluindo os níveis epigenéticos, como metilação de DNA, modificações de histonas e expressão de microRNAs, entretanto os mecanismos exatos ainda estão por melhor elucidados. E desses compostos bioativos, temos na classe dos Flavonóides, especificamente no grupo das Antocianinas, A Delfinidina, que alguns estudos mostram que este composto pode inibir a proliferação de células cancerígenas, estimular a condrogênese, inibição da adipogênese e osteoclastogênese. Porém, ainda são escassos estudos acerca da atuação moduladora sobre células que atuam sobre o sistema imunológico, como as CTM. (HYUN, *et al* 2019; MORIWAKI, *et al.*, 2014; SAULITE, *et al.*, 2019; SILVA, *et al.* 2019; SUZUKI, *et al.*, 2011)

Levando em consideração a capacidade imunorregulatória das CTM e seus possíveis usos terapêuticos. E a Delfinidina, sendo um composto com possíveis atuações inibitórias sobre o sistema imunitário, ainda pouco estudada. Propõe-se nesse trabalho avaliar a influência da Delfinidina, sobre aspectos da capacidade imunorregulatória de CTMs.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O primeiro indício de que a Medula Óssea (MO) continham células precursoras não-hemopoéticas, veio por meio de pesquisas realizadas por Friedenstein (FRIEDENSTEIN, *et al.*, 1976). Este sendo considerado o precursor no isolamento, a partir da MO, de células com propriedades: fibroblastóides, clonogênicas, e alta habilidade para replicação *in vitro* e potencial de diferenciação (AFANASYEV, *et al.*, 2009; DABROWSKA, *et al.*, 2021).

Na MO, a CTM é um importante integrante do microambiente hematopoético. As CTMs, também conhecidas como células estromais mesenquimais multipotentes, são um grupo de células clonogênicas presentes ao longo da MO que originam o estroma de suporte para a hematopoese (KASSEM e ABDALLAH, 2008; HOCKING e GIBRAN, 2010; GARCÍA-GARCÍA, *et al.*, 2015).

Era década de 70, quando dados efetivos da existência de células não-hematopoéticas na MO foram encontrados (FRIEDENSTEIN, *et al.*, 1976). Enquanto estudos posteriores revelaram que as CTMs exibiam capacidade de se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, como de adipócitos, osteoblastos, condrócitos (DABROWSKA, *et al.*, 2021; JUNG *et al.*, 2009; KURODA, *et al.*, 2010; SANTOS, *et al.*, 2020; WATABE e MIYAZONO, 2009). Além disso, estudo do OLIVEIRA, 2010, mostra que as CTMs são capazes de influenciar a atuação de outras células pela interatividade célula-célula ou por meio da secreção de diversos fatores bioativos, como os fatores de crescimento e citocinas (OLIVEIRA, 2010). Bem como, foram comprovados que com os estímulos certos, as CTM têm potencial de se transdiferenciar, adotando perfis de expressão e fenótipos funcionais de células endodérmicas, neuroectodérmicas e mesodérmicas viscerais (EGEA, *et al.*, 2011).

Devido a estes achados, para o *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) estabeleceu três critérios fundamental para considerar uma população celular como CTM, devem apresentar: aptidão de aderência seletiva ao plástico; Cluster de diferenciação (CD) em sua superfície positivos como, presença de CD73 e CD90 e marcadores negativos de CD45 e CD19 e por último a habilidade de diferenciação em Adipócitos, Condroblastos e Osteoblastos (DABROWSKA, *et al.*, 2021; DOMINICI, *et al.*, 2006; HOOGDUIJN, 2015; LE BLANC, *et al.*, 2012).

Sendo assim, as CTMs têm aumentado sua importância no meio científico, devido sua potência terapêutica. Segundo estudos do Lee e Yu 2020, as CTMs desempenham um

papel fundamental na modulação do sistema imunológico no organismo, atuando sobre a produção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, entretanto, seu papel no eixo imunitário precisa ser melhor elucidado (LEE e YU, 2020). Outros estudos mostram que as CTMs evidenciam propriedades sobre o microambiente hematopoiético, como ativação de Células Tronco Hematopoiéticas quiescentes, bem como, indução da sobrevivência, proliferação, inibição, apoptose e diferenciação de células da linhagem hematopoiética, como Monócitos, Células Dendríticas (DC), Linfócitos B e T, *Natural Killer* (NK) (BATSALI, *et al.*, 2020; BUTLER, *et al.*, 2018; DABROWSKA, *et al.*, 2021; DE LUCA, *et al.*, 2016; GAO, *et al.*, 2016; TIMARI, *et al.*, 2017).

## **2.2 CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAIS: ASPECTOS FUNCIONAIS E IMUNORREGULATÓRIOS**

As CTMs têm a capacidade de originar diferentes tipos celulares, dentre os quais, destaque-se a diferenciação em Adipócitos ou Osteoblastos, que podem auxiliar na regulação do nicho hemopoético, além da mesma interferir nas funções das células existentes no microambiente através da liberação de fatores solúveis (BIANCO, *et al.*, 2010; DABROWSKA, *et al.*, 2021; SANTOS, *et al.*, 2020). E devido a essa intervenção que diversos estudos têm considerado as CTMs como uma potente ferramenta terapêutica celular, já que estas células são capazes de articular as funções de células do sistema imunitário, incluindo células B e T, NK, DC, Macrófagos, Monócitos e Neutrófilos, bem como a síntese de angiopietinas, citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (BAIGUERA, *et al.*, 2012; DA SILVA BUTLER, *et al.*, 2018; DE LUCA, *et al.*, 2016; DUFFY, *et al.*, 2011; MEIRELLES, *et al.*, 2008; SHI, *et al.*, 2010; TIMARI, *et al.*, 2017).

E com a plasticidade imunológica das CTM, já existem estudos com modelos animais, mostrando sua possível utilidade para o tratamento de algumas doenças, como por exemplo, doenças autoimunes e sepse. (ABDAL, *et al.*, 2019, GEBLER, *et al.*, 2012; LI, *et al.*, 2019, LEE e SONG, 2018). Essa plasticidade imunológica refere-se ao estímulo inflamatório oriundo do microambiente que se localizam, podendo adquirir um fenótipo pró-inflamatório ou imunossupressor. Ativando um fenótipo pró-inflamatório quando estas, são expostas à produtos microbianos, como dos lipopolissacarídeo (LPS) ou peptídeoglicano (PGN), e ativando um

fenótipo imunossupressor, quando as CTM participam do licenciamento de imunossupressão por meio da presença do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) ou Interferon-gama (INF- $\gamma$ ) no ambiente em que se encontra (DABROWSKA, et al., 2021; DAZZI, *et al.*, 2012; HOOGDUIJN, 2015).

Essa imunossupressão pode ocorrer de diversas formas, como o contato célula-célula e da liberação de fatores solúveis pelas CTM, os quais podem ser mediados por diversas moléculas, como: indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), proteína monocítica quimiotática 1 (MCP-1/CCL2), Fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO), IL-27, antígeno leucocitário humano G (HLA-G), molécula de adesão celular 1 (CAM1) e outros (DOS SANTOS, 2017; GEBLER, *et al.*, 2012; DUFFY, *et al.*, 2011; GAO, *et al.*, 2016; LEE e SONG, 2018).

Enquanto a liberação de IL-6, M-CSF (fator de crescimento de colônias macrófágicas) e PGE2 pelas CTMs tem a capacidade de inibir a diferenciação e maturação de DC, que por consequência diminui a expressão de moléculas co-estimulatórias, e posteriormente alterando o perfil de produção de citocinas nestas células (CHEN, *et al.*, 2008; NAUTA, *et al.*, 2006; PREVOSTO, *et al.*, 2007). As CTMs podem também, impedir a sobrevivência e proliferação das células NK, por meio de síntese de IDO, TGF- $\beta$ , s-HLA-G e PGE2, bem como, por suas propriedades citotóxicas por meio do contato célula-célula (DABROWSKA, et al., 2021; GAO, *et al.*, 2016; HOOGDUIJN, 2015).

E como podemos observar, o NO e IL-6, possuem atuação anti-inflamatória quando secretado pela CTM num microambiente inflamatório. Enquanto o modulador imunológico NO, pode atuar sobre a inibição do ciclo celular em células T, regulação da hematopoiese embrionária, e em algumas pesquisas utilizando CTM e NO, relatam o potencial de aumentar a eficácia terapêutica, inclusive como potente inibidor da apoptose, apesar de sua total atuação não estar bem esclarecido (ALI, *et al* 2012; JALNAPURKAR, *et al* 2019; LI, *et al* 2019; YAO, *et al* 2015). A IL-6, conhecida possui atuação anti-inflamatória quando produzida pelas CTM, pode atuar sobre a sobrevivência celular de monócitos através da indução de produção de IL-10 e diminuição da produção de TNF- $\alpha$ , além da ativação do fator de transcrição STAT3 (HOOGDUIJN, 2015; KYURKCHIEV, *et al.*, 2014; WEISS e DAHLKE, 2019).

Além de agir sobre a regulação das funções das células da imunidade inata, as CTMs podem inclusive atuar sobre células da imunidade adaptativa, tendo maior atuação anti-

inflamatória, por meio da inibição da ativação de células T, havendo ou não aumento no número de células T regulatórias (Treg) (GRIFFIN, *et al.*, 2010). Segundo NAJAR *et al.*, CTMs isoladas de diferentes tecidos, igualmente suprimem a proliferação das populações de células T CD4+ e CD8+ (NAJAR, *et al.*, 2010).

Já em relação as células B, a atuação é resultante do contato célula-célula e de fatores solúveis. Como a produção de TGF- $\beta$  pelas CTM e as interações entre o programa de morte celular 1 (pD1) e seus ligantes, que impossibilitam a proliferação dos Linfócitos B *in vitro*, além da CTM fornecer suporte à proliferação, diferenciação e sobrevivência das células B secretoras de antígenos em humanos (AUGELLO, *et al.*, 2005; CORCIONE, *et al.*, 2006; KRAMPERA, *et al.*, 2006; RASMUSSON, *et al.*, 2007; TRAGGIAI, *et al.*, 2008). E as CTMs mostram uma subpopulação produtora de IL-17 que age de forma autócrina ativando a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), inibindo por consequência, a produção de TGF- $\beta$  por estas células e comprometendo, desta maneira, suas propriedades imunossupressoras (KRSTIC, *et al.*, 2012; YANG, *et al.*, 2013).

Adicionalmente a mudança de fenótipo inflamatório, se deve as duas principais vias, a do NF- $\kappa$ B e STAT. Enquanto o desenvolvimento do fenótipo pró-inflamatório das CTM, se dá principalmente por meio de estímulo microbiano (LPS ou PGN), que ativa a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que leva a síntese de mediadores pró-inflamatórios como, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1, GM-CSF, que são capazes de controlar a infecção por meio da liberação de diversos mediadores secundários, da indução de ativação e quimiotaxia, proliferação, maturação, sobrevivência, morte de células imunes, estimular a diferenciação em Macrófago perfil 1 (M1) (fenótipo pró-inflamatórios) e atuam sobre o aumento da migração de neutrófilos para os sítios de inflamação (DAVERI *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2013; MURDOCK e NÚÑEZ, 2016; SANTOS, *et al.*, 2020; ULIVI *et al.*, 2014)

O fenótipo anti-inflamatório das CTMs, ocorre por meio da ligação de citocinas aos seus receptores dos tipos I e II, que ativa a transdução de sinais por tirosinocinases, denominadas de Janus quinases (JAKs), possibilitando sua fosforilação. Com a fosforilação, acontece o recrutamento das proteínas monoméricas Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (STAT), que são fosforiladas, e como consequência um monômero STAT consegue ligar-se a uma STAT adjacente, formando um dímeros de STAT, que migram para o núcleo, iniciando a transcrição de genes relacionados a liberação de mediadores que irão inibir a funcionalidade e proliferação de células do sistema imunitário, como por exemplo: PGE2, NO, IDO, IL-10 e

fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (GLENN e WHARTENBY, 2014; HOOGDUIJN, 2015; VILLARINO *et al.*, 2015).

Pode-se dizer, então, que o perfil imunorregulatório da CTM depende do microambiente em que se encontra e é de extrema relevância na regulação do sistema imunitário como um todo.

### 2.3 DELFINIDINA

A literatura relata uma gama compostos presentes nos alimentos que podem atuar nos mais variados processos fisiológicos modulando o sistema imunológico. Dentre essas substâncias, destacam-se as Antocianinas, pertencentes à classe de compostos fenólicos denominados coletivamente Flavonoides (SARI, *et al.*, 2019).

As Antocianinas (do grego *anthos*, que significa flor, e *kyanos* que significa azul) são pigmentos vegetais notáveis ao olho humano, que pertencem à ampla classe de compostos fenólicos da família dos Flavonoides. Estes são glicosídeos de derivados poli-hidroxi e poli-metoxi de sais de 2-fenilbenzopirílio ou flavílio. As diferenças distintas entre as Antocianinas correspondem com o número de grupos hidroxila, a natureza e número de açúcares ligados à molécula, a posição desta ligação e sua natureza e número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares ligados nas posições 3, 5 e 7 da molécula. No caso dos Flavonoides, a estrutura química das Antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos (CHEN, *et al.*, 2019; KONG, *et al.*, 2008; LOPES, *et al.*, 2007; TERCI e ROSSI, 2002)

Dos glicosídeos das antocianinas não metiladas, temos a Delfinidina 3-glicosídeo, de fórmula molecular  $C_{21}H_{21}ClO_{12}$ , peso molecular de 500.84 g/mol, possui uma estrutura de anel polifenólico contendo o composto que carrega uma carga positiva em seu anel central (HAFEEZ, *et al.*, 2008; HYUN, *et al.*, 2019; KONG, *et al.*, 2008; LOPES, *et al.*, 2007;).

Já ao verificar estudos acerca do uso da Delfinidina sobre as CTM, estudo de SUZUKI e colaboradores, mostrou que a exposição a extratos de mirtilo, rico em antocianinas como a Delfinidina, inibiu a diferenciação do pré-adipócito 3T3-L1 em adipócitos (SUZUKI, *et al.*, 2011).

Já o estudo de SAULITE e colaboradores, que teve como objetivo, analisar o efeito das Antocianidinas como, Malvidina , Cianidina e Delfinidina na diferenciação das CTM

derivadas do tecido adiposo em adipócitos, osteócitos e condrócitos, mostraram que a Delfinidina agiu sobre a inibição da adipogênese, por meio da desregulação dos genes *FABP4* e *adiponectina* relacionado ao tecido adiposo, e a diminuição da expressão de *PPAR- $\gamma$*  e os níveis de mRNA *SREBP1c*, sendo este responsável por induzir o *PPAR- $\gamma$* , promovendo a diferenciação da CTM em adipócito, resultando na diminuição de acúmulo de lipídios. Ademais, a Delfinidina ainda mostrou estímulo da condrogênese pela regulação positiva dos marcadores estruturais de condrócitos articulares *Col2a1* e *agrecano*. E ao se analisar seus efeitos sobre a osteogênese, a Delfinidina se mostrou favorável à diminuição do depósito de cálcio, sendo necessários mais estudos *in vivo* para investigar seu potencial em terapias contra osteoartrite, anti-obesidade, osteoporose (SAULITE, *et al.*, 2019).

Demais estudos com o uso de Delfinidina, reforça a atuação dessa Antocianina sobre inibição da adipogênese, e da inflamação em decorrência da obesidade, bem como, inibição da osteoclastogênese, quando comparada a outras Antocianinas, como Cianidina e Peonidina, levando a hipótese que a ingestão de Delfinidina atua como potente agente anti-osteoporótico, devido inibição da osteoclastogênese (DAVERI, *et al.*, 2018; DAYOUB, *et al.*, 2013; MORIWAKI, *et al.*, 2014; SOGO *et al.*, 2015).

Além do mais, no contexto das antocianinas com propriedades bioativas, a Delfinidina merece destaque devido as suas possíveis propriedades anti-inflamatórias. Estudos realizados *in vitro*, bem como *in vivo* tem mostrado que os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes (GURREA, *et al.*, 2017; SARI, *et al.*, 2019), com capacidade de diminuir a produção do ânion superóxido, associando esse efeito com a Redução do estresse oxidativo (DÁVALOS, *et al.*, 2009). Ademais a literatura tem mostrado seus efeitos atuando na inibição do crescimento celular, tanto de células normais quanto em células cancerígenas, bem como possíveis efeitos inibitórios nas vias de sinalização indutoras do fator de transcrição do NF- $\kappa$ B (DAYOUB, *et al.*, 2017; OH, *et al.*, 2008; SARI, *et al.*, 2019; WATSON e SCHÖNLAU, 2015; YOU, *et al.*, 2015).

Segundo estudo de HYUN *et al.*, 2019, o uso da Delfinidina combinado com o ácido gálico, obteve como resultado aumento da diferenciação das células Treg, e supressão da função das células T da memória, tendo essa combinação o potencial de serem utilizados como agentes imunossupressores em pacientes transplantados e com doenças autoimunes ou ser modelo para o desenvolvimento de alimentos associados ao sistema imunológico (HYUN, *et al.* 2019).

No entanto, ainda existem poucos estudos indicando os efeitos da Delfinidina sobre células com grande potencial imunorregulatório, no contexto inflamatório/imunológico que a CTM pode atuar, se fazendo necessário mais estudos acerca da atuação da Delfinidina sobre a capacidade de modular o sistema imunitário que a CTM possui.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo estudar os efeitos da Delfinidina sobre algumas propriedades imunorregulatórias das Células-Tronco Mesenquimais.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar a padronização da dose por avaliação do ciclo celular e viabilidade por Citometria de Fluxo, analisar a produção de fatores solúveis pelas CTM por técnica de ELISA (IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , IL-10, PGE<sub>2</sub>, NO), analisar as propriedades imunorregulatórias da CTM, sobre as células RAW 264.7, por meio da cultura condicionada, ensaio de MTT para análise do metabolismo celular, avaliação da síntese de citocinas pelas RAW 264.7 por técnica de ELISA (IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), e avaliação da expressão dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e STAT-3 por técnica de *Western Blotting* sob as CTM e RAW 264.7.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. CULTIVO DAS C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>**

Foram utilizadas culturas de CTM da linhagem C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>. O cultivo dessas células foi conduzido em frascos de cultura com meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro bovino fetal e tampão Hepes (2g/L) com pH final entre 7,2 a 7,4, e a linhagem foi adicionada a incubadora em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO<sub>2</sub> á 37°C, para proliferação celular e aderência a garrafa, sendo seu meio de cultura trocado a cada 3 ou 4 dias, passando a fase log de crescimento celular, e posteriormente plaqueadas.

Para avaliação dos efeitos da Delfinidina 3-O-β-D-glicosídeo (Sigma-Aldrich- 73705 Lot# BCBZ6689) e escolha das doses sobre as CTMs, essas células foram tratadas com algumas doses (1 μM, 5 μM 25 μM, 50 μM, 100 μM e 200 μM), pelo tempo de 24 horas, onde após avaliação por técnica de Citometria de fluxo, as doses 50 μM e 100 μM foram definidas, além do controle, com e sem estímulo de 1.25 μg/mL de LPS padronizado pelo laboratório (FOCK, 2005). Todas as culturas, devido à sensibilidade da Delfinidina a iluminação, foram realizadas com a luz do Fluxo desligados.

### **4.2. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE POR CITOMETRIA DE FLUXO**

A avaliação da apoptose das CTM após exposição a Delfinidina, foi realizada para decisão da dosagem, onde foi feita marcação das células com Anexina-V e 7-AAD. Após tripsinação, foram adicionadas 50 μl de tampão de anexina V, 3 μL de anexina V-FITC (Becton e Dickinson, # BD 556419) ((molécula esta que se liga à fosfatidilserina, a qual é externalizada durante o processo de morte por apoptose) e 8 μL de Iodeto de Propídio (PI) (PI; Becton e Dickinson, # BD 556463) (molécula que se intercala entre as bases do DNA de células em processo de morte necrose, desde que sua membrana esteja permeável). As células ficaram incubadas durante 20 min protegidas da luz. Após este período as células foram ressuspensas em 200 μL de tampão Anexina para leitura no citômetro de fluxo. Todas as amostras foram posteriormente analisadas no software package FlowJo 7.6® (TreeStar).

### **4.3. AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Para a avaliação do ciclo celular das CTM após tratamento com Delfinidina, foram preparadas placas de 12 poços com 1x10<sup>6</sup> células/poço. As células da placa foram expostas por

24 horas a Delfinidina em diferentes concentrações, com 1.25 µg/ml estimulados com LPS e não estimulados com LPS e mantidas em incubadora em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO<sub>2</sub> á 37°C. E devido a sensibilidade da substância a luz, até o momento pós tripsinização, o procedimento era realizado em ambiente com baixa luminosidade.

Após, as células foram retiradas da placa com uso de tripsina e ressuspensas em meio DMEM. O sobrenadante foi centrifugado por 7min a 1500rpm, descartado o sobrenadante e depois adicionado ao pellet 200µl de Triton 1% e 20µL de RNase (Sigma, LOT48H9200), logo após, os tubos foram mantidos em Banho-Maria a 37° C por 25 minutos. Em seguida foram adicionados aos tubos 5µl de Iodeto de Propídeo e estes mantidos em Banho-Maria a 37° C por mais 5 minutos. Após isso, os tubos foram para leitura no citômetro. A análise se deu pela quantificação da porcentagem das regiões G0/G1 e S/G2/M, utilizando o programa FlowJo 7.6<sup>®</sup> (TreeStar).

#### **4.4. DOSAGEM DE FATORES SOLÚVEIS POR ELISA**

As células C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> que ficaram em cultura a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de cultura com 6 poços na concentração de 1x10<sup>6</sup> células por poço, em volume total de 1 ml/poço, e que foram cultivadas na presença e ausência de Delfinidina e estimuladas ou não com LPS. Após 24 horas, o sobrenadante dessas culturas celulares foi separado em microtubos, identificados e congelado (-40 °C) para posterior dosagem das citocinas presentes. A determinação da concentração de IL-1β (Catálogo DY401, R&D System), IL-6 (Catálogo DY406, R&D System), IL-10 (Catálogo DY417, R&D Systems, TGF-β (Catálogo DY1679-05 R&D System), PGE2 (Catálogo 514010, Cayman), presentes no sobrenadante das culturas celulares foram realizadas pelo método de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), seguindo as orientações do fabricante, e dosagem de NO pelo Analisador de Óxido Nítrico (NOATM).

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NF-KB (TOTAL E FOSFORILADO) E STAT 3 (TOTAL E FOSFORILADO) NAS CTMs**

A expressão do NF-κB total e fosforilado, bem como do STAT3 total e fosforilado em células C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> mantidos sob cultura como descrito acima, foram determinados pela técnica de *Western Blotting*. Quando as C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> ficaram confluentes, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min, e semeadas em placas de seis poços numa densidade de 1×10<sup>6</sup> células por ml de meio DMEM, em poços controle e 50 µM de Delfinidina, pelo período

de 24 h, em poços sem e com estímulos por este mesmo tempo com 1,25 µg/ml de LPS para as células, padronizado pelo laboratório (FOCK, 2005).

#### **4.5.1. SDS-PAGE E “WESTERN BLOTTING”**

##### **4.5.1.1. PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA**

Foi procedido conforme protocolo de SAMBROOK *et al.*, (1989) e HARLOW e LANE (1988), descrito sucintamente a seguir. Os géis foram preparados em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. E o gel inferior (resolutivo) será preparado com 6 a 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

##### **4.5.1.2. PREPARO DE LISADO DE PROTEÍNAS PARA SDS-PAGE E “WESTERN BLOTTING”**

Os lisados foram preparados a partir de  $1 \times 10^6$  células em tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 100 µg/ml PMSF, 0,5 mM EDTA). O material foi vortexizado por 30 segundos, centrifugado por 15 min, a 15.000 rpm, e 4°C. O sobrenadante foi quantificado e o volume correspondente a 200µg foi misturado ao tampão de amostra (3 x concentrado, 100 mM Tris.HCL, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol), levadas ao Dry block por 10 min a 100°C, para desnaturação das proteínas e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida.

##### **4.5.1.3. TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS DO GEL PARA A MEMBRANA (NITROCELULOSE)**

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubada por 10 min em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS, 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e então também incubada em tampão de transferência, após ser montada na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel 3MM, membrana, gel, 2 folhas de 3 MM (Whatman), esponja. Logo após foi realizado à transferência em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 100 mA, por 120 min.

#### 4.5.1.4. SONDAGENS DAS PROTEÍNAS COM ANTICORPOS

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico<sup>®</sup>, a 5%, em tampão TBS, por 2h, sob agitação. Os anticorpos primários como, anti-p NF-κB (Ser 311, # sc-33039), anti-NF-κB (C-20, # sc-372), -pSTAT-3 (Ser 727, # sc-8001-R) e STAT-3 (C20, #sc-482) da Biotecnologia Santa Cruz, foram diluídos em tampão TBS-Tween, respectivamente, numa diluição 1:1000 e incubado as membranas por 4-14 h, com agitação, à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com TBST. As proteínas eram sondadas com anticorpo Anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (R&D Systems), diluído 1:10.000 em TBST, por 2 horas, sob agitação, e lavada 3 vezes por 10 min sob agitação.

#### 4.5.1.5. REVELAÇÃO COM SISTEMA QUIMIOLUMINESCENTE

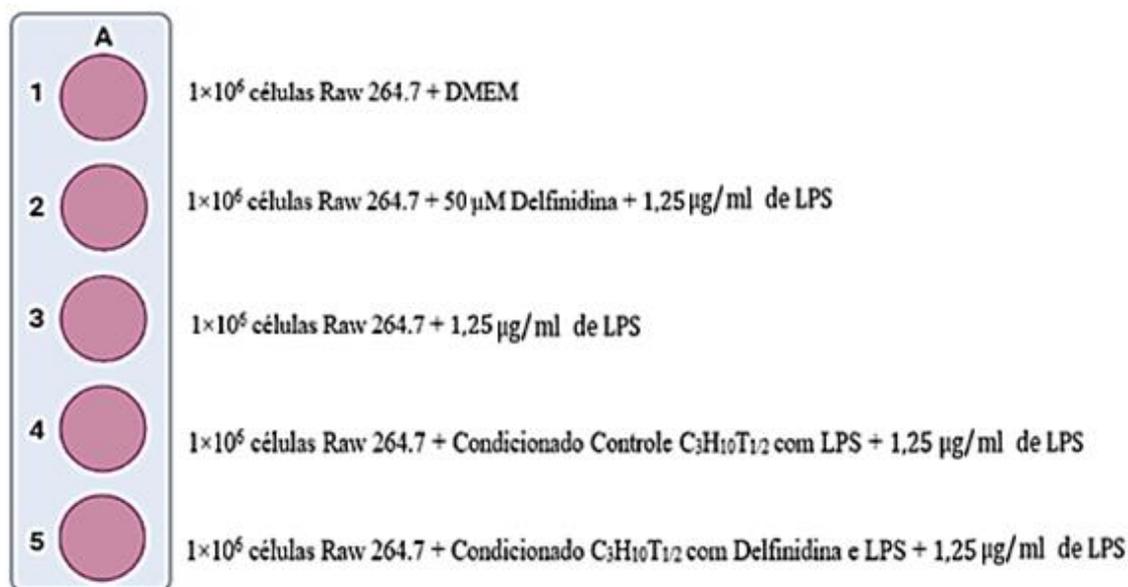
A revelação das bandas reativas, foram visualizadas utilizando-se o Kit ECL system<sup>®</sup> (Amersham Biosciences), e as imagens foram capturas utilizando o digitalizador de Imagem ImageQuant 400 (GE Helthcare). Para padronização e quantificação, as imagens foram analisadas usando o ImageQuant TL<sup>®</sup> (Amersham Biosciences). Os resultados foram normalizados pela β-actina (Sigma, St. Louis, EUA, #A3854), que foi diluído para 3: 10.000 em tampão TBS-Tween, por 40 minutos.

#### 4.6. CULTURA COM SOBRENADANTE DE CTM EM CÉLULAS RAW 264.7

Na fase seguinte do projeto, a influência imunorregulatória das CTMs foi avaliada sobre células da linhagem Raw 264.7 (*mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*). O cultivo da linhagem foi conduzido em frascos de cultura com meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal e tampão Hepes (2g/l) com pH final entre 7,2 a 7,4. As células foram incubadas em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, para proliferação celular. Inicialmente o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias, passado a fase log de crescimento celular. Após esse período as células foram plaqueadas aproximadamente a cada 2 dias, para manter a confluência das células próximo de 70%. Após confluência das células foram removidas com auxílio de um raspador de células, centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min, em seguida, semeadas em placas de 5 poços numa densidade de 1×10<sup>6</sup> células/ml de meio DMEM, conforme descrito na (figura 1). Após o período de 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e acondicionados à temperatura de -40°C para a determinação da produção de citocinas (IL1-β, IL-10, TNF-α, IL-12) por ELISA, e uma parte das células foram utilizadas para determinação

da expressão das proteínas NF- $\kappa$ B (total e fosforilado) e STAT3 (total e fosforilado) e outra parte das células foram utilizadas para avaliação do metabolismo celular determinado pelo ensaio de MTT como descrito abaixo.

**Figura 1 – Esquemática da placa de cultivo com a célula Raw 264.7**



**Figura 1-** Esquemática da placa de cultivo com a célula Raw 264.7. Fonte: Criação própria pelo software BioRender.com

#### 4.6.1. ENSAIO DE MTT PARA RAW 264.7 CULTIVADAS

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, que baseia-se na capacidade das células viáveis de Reduzirem metabolicamente o sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura, que se acumula no citoplasma celular (MOSMANN, 1983). Dessa forma, o ensaio de MTT avalia a atividade mitocondrial representativa de células viáveis pela quantificação da atividade da desidrogenase.

Após 24 horas de exposição das Raw 264.7 aos seus respectivos poços, o meio de cultura foi aspirado, e adicionados 100  $\mu$ L da solução de MTT (5mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) + 900  $\mu$ L de DMEM por poço da placa, que foram incubadas por 3h30min à 37°C. Posteriormente, a solução foi aspirada e 1000 $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados por poço para a dissolução dos cristais de formazan e foram incubadas por 30min sob agitação constante a 37°C, e a absorbância dos cristais de formazan dissolvidos em DMSO foi medida a 540 nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek<sup>®</sup> Instrumentals, Winooski, EUA).

#### 4.6.2. DOSAGENS DE CITOCINAS PELAS RAW 264.7

As células Raw 264.7 que foram cultivadas conforme item 4.6, e que tiveram seus sobrenadantes congelado (-40 °C) teve sua determinação da concentração de IL-1 $\beta$  (Catálogo DY401, R&D System), IL-12 (Catálogo DY419, R&D System), IL-10 (Catálogo DY417, R&D Systems), TNF- $\alpha$  (Catálogo DY410, R&D System), presentes no sobrenadante das culturas celulares realizadas pelo método de ELISA, seguindo as orientações do fabricante.

#### 4.6.3. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS NF-KB (TOTAL E FOSFORILADO) E STAT 3 (TOTAL E FOSFORILADO) NAS RAW 264.7

A expressão do NF- $\kappa$ B total e fosforilado, bem como do STAT3 total e fosforilado nas células 264.7 mantidos sob cultura como descrito acima, foram determinados pela técnica de *Western Blotting*. Como comentado, as células RAW 264.7, após ficarem confluentes, foram coletadas com auxílio de um raspador de células, centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min, em seguida, semeadas em placas de 5 poços numa densidade de  $1 \times 10^6$  células por ml de meio DMEM, em poços controle, poços com RAW 264.7 + 50 $\mu$ M Delfinidina + LPS, poços com RAW 264.7 + LPS, poços com cultura condicionada controle LPS de C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> + RAW 264.7 + LPS e poços com cultura condicionada de C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub> com 50 $\mu$ M Delfinidina e LPS + RAW 264.7 + LPS, pelo período de 24 horas. Os poços com LPS continham 1,25  $\mu$ g / ml de LPS para as células. Após esses períodos de cultivo as células foram lisadas com tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 1  $\mu$ g/ml leupeptina, 100  $\mu$ g/ml PMSF, 0,5 mM EDTA) e os demais procedimentos do *Western Blotting* foram seguidos como descritos no item 4.5.1.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

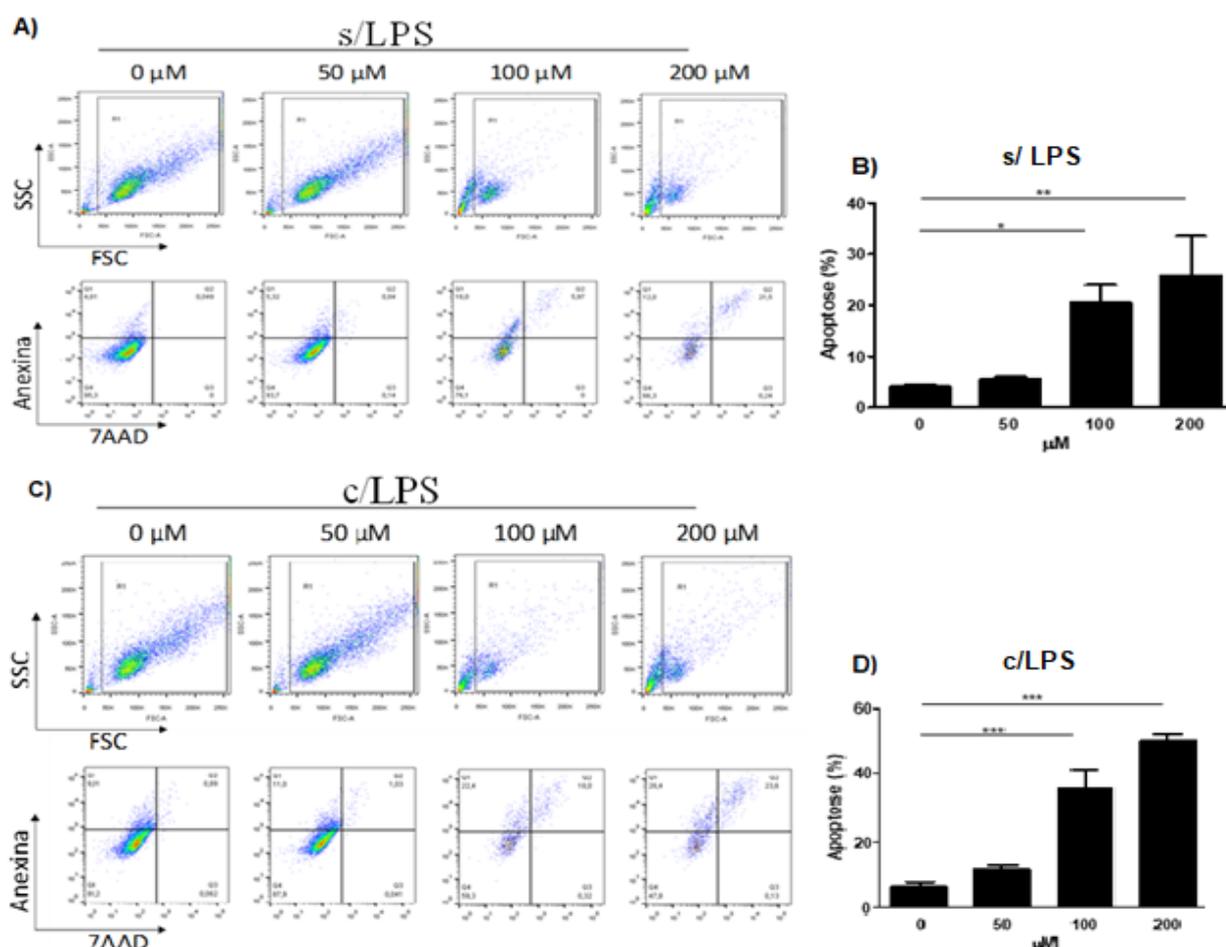
Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Normal (curva Gaussiana) e foi aplicado o ANOVA de 1 via com pós teste Dunnett para padronização das doses e ANOVA de 2 vias com pós teste de Bonferroni, nas demais comparações com duas variáveis: LPS e Delfinidina. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ , com nível de significância de 95%.

## 5.0. RESULTADOS

### 5.1. EFEITO DA DELFINIDINA NA VIABILIDADE CELULAR EM CTMS PARA PADRONIZAÇÃO DA DOSE

A viabilidade celular, foi realizada por Citometria de Fluxo utilizando anexina e iodeto de propídeo. A citotoxicidade da Delfinidina 3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (Sigma-Aldrich- 73705 Lot# BCBZ6689) contra CTMs foi testada na concentração na faixa de 50 a 200  $\mu$ M após períodos de incubação de 24h, na ausência ou presença de LPS. Células cultivadas tanto estimulados ou não com LPS mostraram aumento significativo na porcentagem de células em estado apoptótico, quando estas foram cultivadas com doses de Delfinidina de 100  $\mu$ M e 200  $\mu$ M. Após análises, concentrações maiores que 50  $\mu$ M foram descartadas para o estudo das etapas subsequentes (figura 2a-d).

**Figura 2: Avaliação da Viabilidade Celular para padronização da dose**

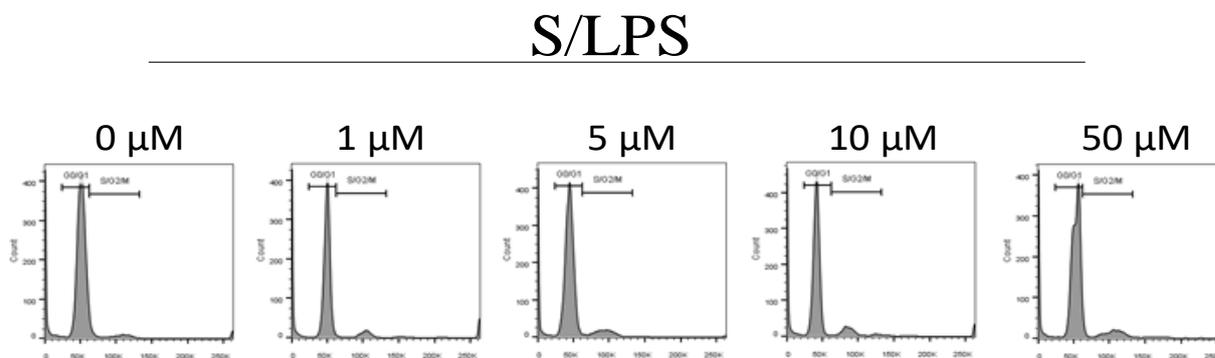


**Figura 2 - Avaliação da Viabilidade Celular para Padronização da dose.** Células cultivadas em diferentes doses de delfinidina, sem estímulo com LPS (2a) e estimulado com LPS (2c), onde: Q1: Apoptose; Q2: Apoptose Tardia; Q3: Necrose; Q4: Viáveis. 2b e 2d: Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). (n=3, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

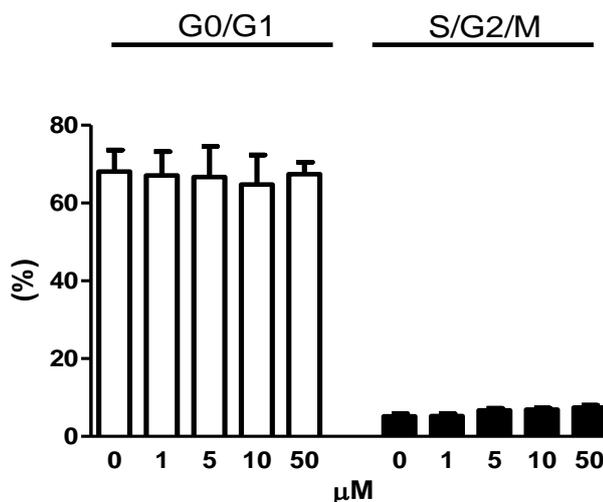
## 5.2. EFEITO DA DELFINIDINA NO CICLO CELULAR EM CTMS

Como comentado anteriormente, para a definição da dose a ser empregada no estudo, doses maiores que 50  $\mu\text{M}$  de Delfinidina foram descartadas. Assim para avaliação dos efeitos da Delfinidina no ciclo celular foram escolhidas doses no intervalo de 1 a 50  $\mu\text{M}$ . O status do ciclo celular das CTM foi avaliado em células não estimuladas com LPS (figura 3 e gráfico 1) e em células estimulada com LPS (figura 4 e gráfico 2). Os resultados mostraram que as células não estimuladas com LPS, independente da dose de Delfinidina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas entre si (figura 3 e gráfico 1). Entretanto, em células estimuladas com LPS observamos que quanto maior a dose de Delfinidina testa maior a porcentagem de células nas fases S/G2/M do ciclo celular (figura 4 e gráfico 2). Baseado nesses resultados e em acordo com os resultados obtidos em relação a apoptose, definiu-se a dose de 50  $\mu\text{M}$ , como dose de escolha para os experimentos subsequentes.

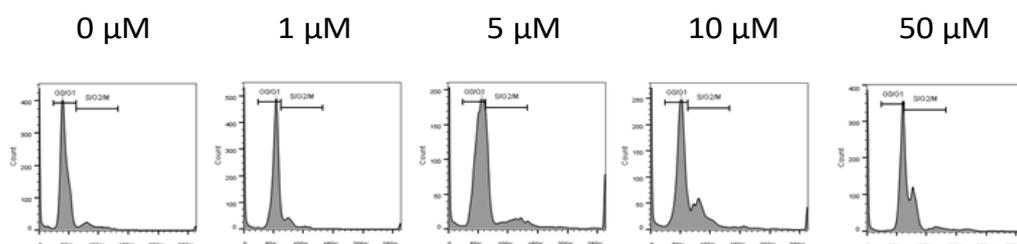
**Figura 3: Avaliação do Ciclo Celular em histograma do grupo sem LPS**



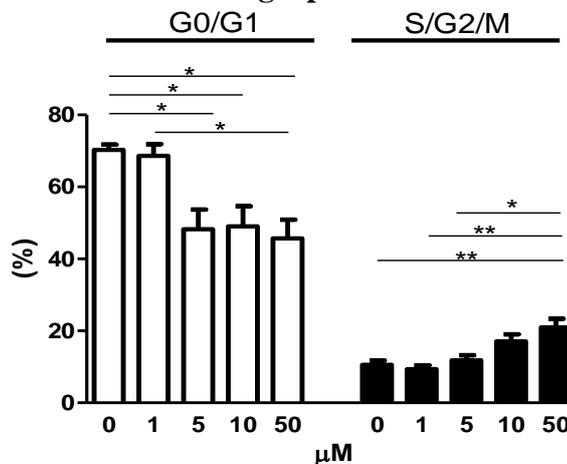
**Figura 3 -** Avaliação do Ciclo Celular em histograma do grupo sem LPS. Células cultivadas em diferentes doses de delfinidina sem estímulo com LPS. ( $n=3$ ,  $n$  representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo).

**Gráfico 1: Avaliação do Ciclo Celular do grupo sem LPS**

**Gráfico 1** - Avaliação do Ciclo Celular do grupo sem LPS. Células cultivadas em diferentes doses de delfinidina sem estímulo de LPS. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). ( $n=3$ ,  $n$  representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo).

**Figura 4: Avaliação do Ciclo Celular em histograma do grupo com LPS**

**Figura 4** - Avaliação do Ciclo Celular em histograma do grupo com LPS. Células cultivadas em diferentes doses de delfinidina com estímulo de LPS. ( $n=3$ ,  $n$  representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo).

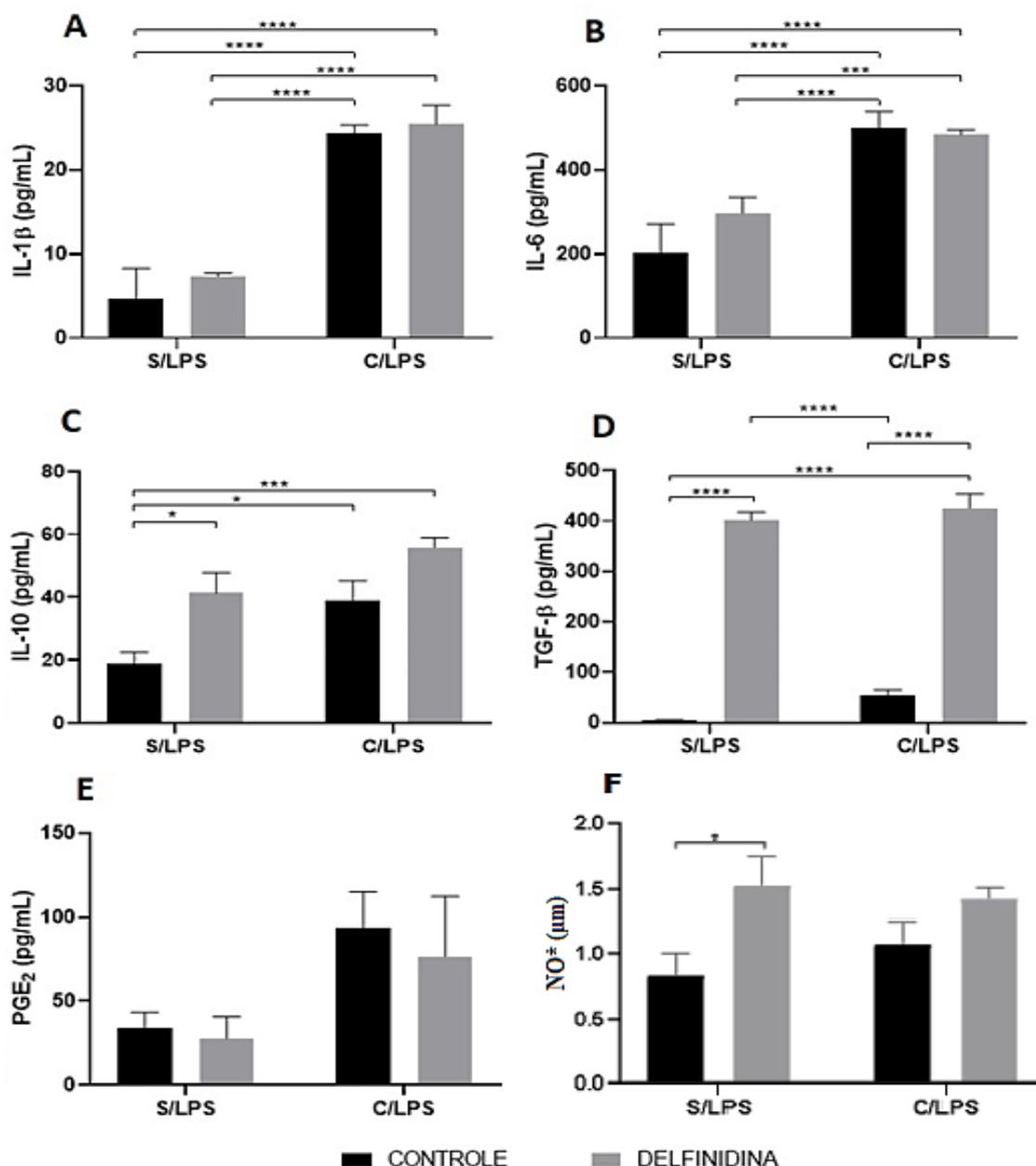
**Gráfico 2: Avaliação do Ciclo Celular do grupo com LPS**

**Gráfico 2** - Avaliação do Ciclo Celular do grupo com LPS. Células cultivadas em diferentes doses de delfinidina e estimuladas com LPS. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). ( $n=3$ ,  $n$  representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo).  $*p \leq 0,05$  e  $**p \leq 0,01$ .

### 5.3. EFEITO DA DELFINIDINA NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CTMS

Uma vez definida a dose de 50  $\mu$ M de Delfinidina a ser utilizada, as CTMs foram cultivadas na presença ou ausência de Delfinidina e estimuladas ou não com LPS, com o intuito de avaliar a influência da Delfinidina sobre a capacidade de modular a síntese de importantes citocinas com ação imunorregulatória. Como resultados, foi observado aumento da síntese de IL-1 $\beta$  quando as CTM foram estimuladas com LPS quando comparadas com seu respectivo controle (Gráfico 3-A). Adicionalmente, quando avaliado a síntese de IL-6, observamos comportamento semelhante ao observado com a IL-1 $\beta$ , onde apesar do LPS aumentar a síntese de IL-6, não foram observamos efeito da Delfinidina em modular a síntese de IL-6 (Gráfico 5-B). já ao avaliar a expressão de citocinas conhecidas com atuação anti-inflamatória como a IL-10, TGF- $\beta$ , PGE2 e NO. As análises mostraram aumento de IL-10, quando as CTM foram tratadas com Delfinidina sem estímulo de LPS quando comparado com seu respectivo controle (Gráfico 3-C). Em relação a síntese de TGF- $\beta$ , os resultados mostraram que CTMs tratadas com Delfinidina estimuladas ou não com LPS apresentaram aumento acentuado de sua síntese, quando comparadas com seus respectivos controles (Gráfico 3-D). Além disso, ao se analisar a produção de PGE2, apesar de observarmos tendência à aumento da síntese de prostaglandina E2 quando as células foram estimuladas com LPS, não foi observado diferenças entre os grupos estudados (Gráfico 3-E). Ademais, em relação a síntese de Oxido Nítrico (NO), houve resultados significativos em comparativos no grupo sem LPS, entre controle e Delfinidina, porém células estimuladas com LPS, apesar de apresentarem tendência de aumento, não foram observadas diferenças estatísticas (gráfico 3-F).

**Gráfico 3: Resultado da produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6, (C) IL-10, (D) TGF- $\beta$ , (E) PGE<sub>2</sub> e (F) NO pelas CTMs**



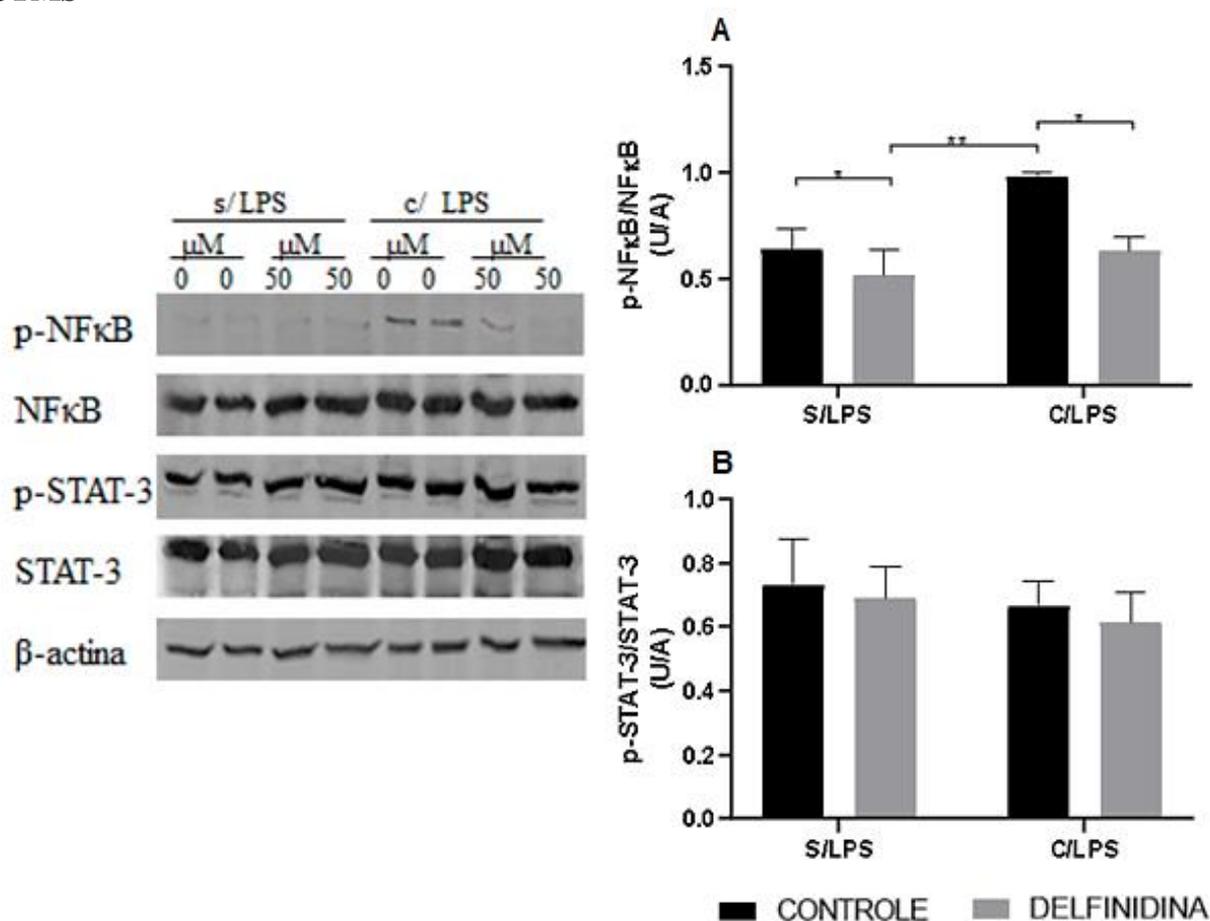
**Gráfico 3** – Resultado da produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6, (C) IL-10, (D) TGF- $\beta$ , (E) PGE<sub>2</sub> e (F) NO pelas CTMs. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) do grupo controle sem LPS (n=6), grupo Delfinidina sem LPS (n=6), grupo controle com LPS (n=6), grupo Delfinidina com LPS (n=6). *n* representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  e \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

#### 5.4. EFEITO DA DELFINIDINA NA EXPRESSÃO DE NF $\kappa$ B E STAT-3 POR CTMs

Dado que os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e STAT-3 têm papel importante da resposta inflamatória avaliamos o efeito da Delfinidina sob a expressão desses fatores. As análises

mostraram que ao avaliar a expressão proteica da relação p-NFκB/NFκB, foi observado diferenças significativas entre os grupos, desse modo, tanto células estimuladas ou não com LPS apresentaram redução na expressão desse fator de transcrição quando cultivadas com Delfinidina (Gráfico 4-A). Em relação a expressão da relação p-STAT-3/STAT-3 (Gráfico 4-B) não observamos diferenças estatísticas entre os grupos estudados. NF-κB.

**Gráfico 4: Resultado dos efeitos da Delfinidina na expressão de NF-κB e STAT-3 por CTMS**

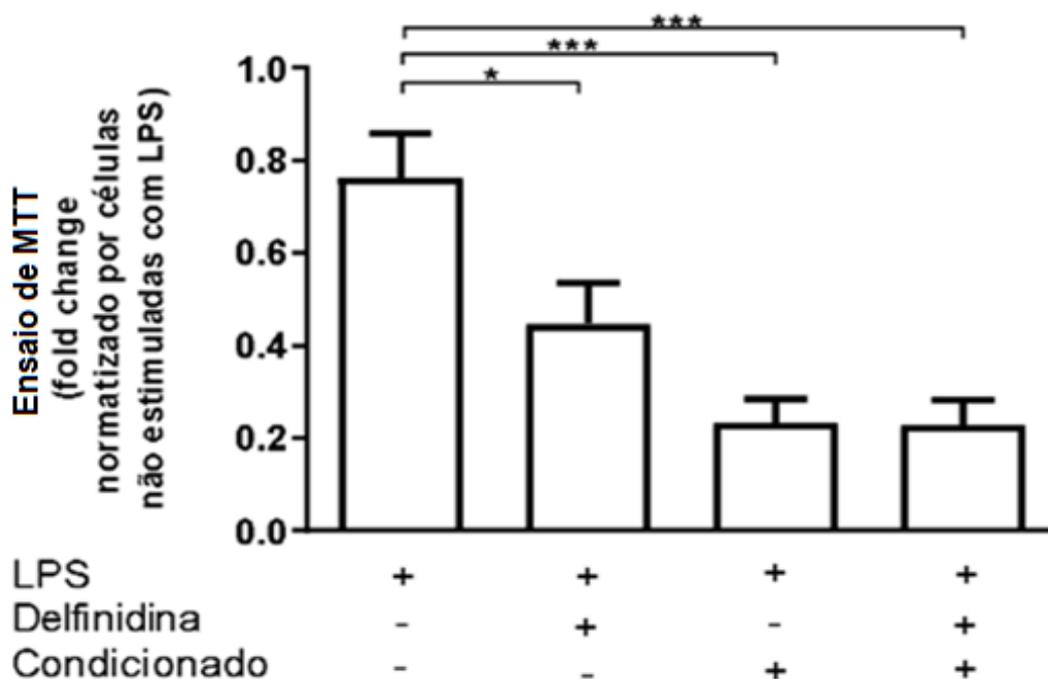


**Gráfico 4** - Resultado dos efeitos da Delfinidina na expressão de NF-κB e STAT-3 por CTMS. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da expressão da razão pNFκB / NFκB e expressão da razão pSTAT3 / STAT3 (n=6). Os resultados foram representados em relação à intensidade da β-actina e são expressos em unidades arbitrárias. n representa o número de amostras utilizadas por grupo estudado. \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

### 5.5. EFEITO DO SOBRENADANTE DE CTMS E DELFINIDINA NA VIABILIDADE RAW 264.7 POR ENSAIO DE MTT

Com o objetivo de avaliar o efeito da Delfinidina sobre a atividade metabólica de células macrofágicas quando cultivadas em meio condicionado de CTMs o ensaio de MTT foi realizado. Como resultados observamos que a Delfinidina *per se* foi capaz de diminuir a atividade metabólica, bem como os meios condicionados de CTMs, entretanto nesse caso independentemente da Delfinidina. (Gráfico 5).

**Gráfico 5: Resultados dos efeitos do sobrenadante de CTMs e Delfinidina na viabilidade Raw 264.7 por ensaio de MTT**



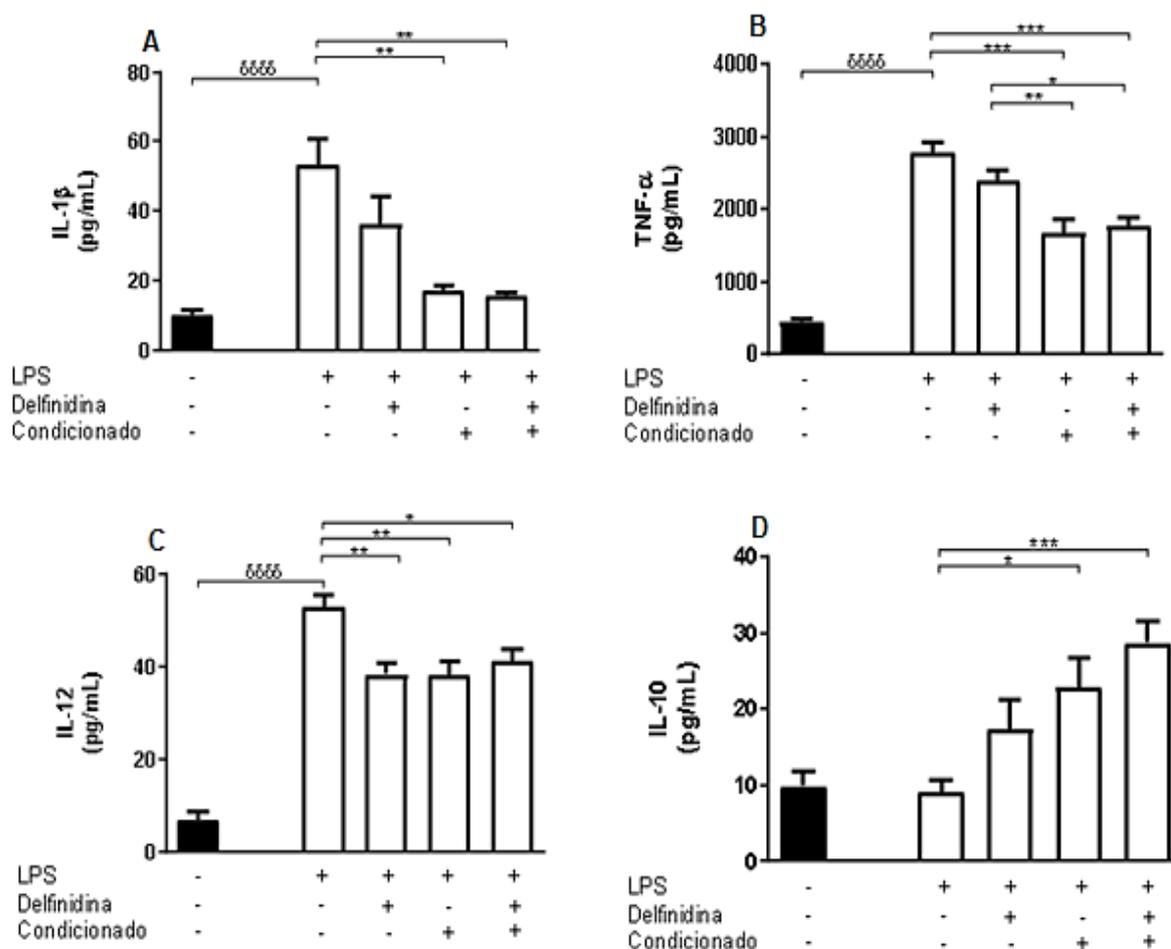
**Gráfico 5** - Resultados dos efeitos do sobrenadante de CTMs e Delfinidina na viabilidade Raw 264.7 por ensaio de MTT. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). ( $n=5$ ,  $n$  representa o número de amostras utilizadas por grupo estudado). \*  $p \leq 0,05$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 5.6. EFEITO NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS RAW 264.7 CULTIVADAS NA PRESENÇA DE SOBRENADANTE DE CTMS E DELFINIDINA

Com o objetivo de avaliar a influência da Delfinidina em modular a capacidade imunorregulatória das CTMs, células de linhagem macrófágica (Raw 264.7) foram utilizadas e avaliadas a produção de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ ). Como resultados, foi observado que o meio condicionado de CTMs, independente da Delfinidina, foi capaz de diminuir a de IL-1 $\beta$  das células macrófágicas (Gráfico 6-A). Em relação a síntese de TNF- $\alpha$  pelas células macrófágicas, foi observado diminuição da síntese dessas citocinas de forma acentuada nos grupos de cultura condicionada em comparação com o grupo de macrófagos estimulados somente com LPS, porém não foram observadas diferenças entre grupos cultivados ou não na presença de Delfinidina (Gráfico 6-B). Adicionalmente, em relação a síntese de IL-12, foi observado que o meio condicionado também foi capaz de diminuir a produção dessa citocina em células de linhagem macrófágica, porém esses resultados mostram que a

Delfinidina por si é capaz de diminuir a síntese dessa citocina nessas células (Gráfico 6-C). Em relação a IL-10, apesar de observamos tendência à aumento dessa citocina produzida por células da linhagem macrófágica quando cultivada com Delfinidina não foram estatisticamente significativas (Gráfico 6-D). Entretanto, foi observado que o meio condicionado de CTMs é capaz de estimular aumento de IL-10 em células da linhagem macrófágica, sendo esse aumento mais acentuado quando as células da linhagem macrófágicas são cultivadas em meio condicionado de CTMs que forma cultivadas na presença de Delfinidina (Gráfico 6-D), assim revelando influência não somente do sobrenadante de CTMs sobre as células da linhagem macrófágica, mas também da Delfinidina.

**Gráfico 6: Resultado da produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-12, (D) IL-10 pelas Raw 264. 7**

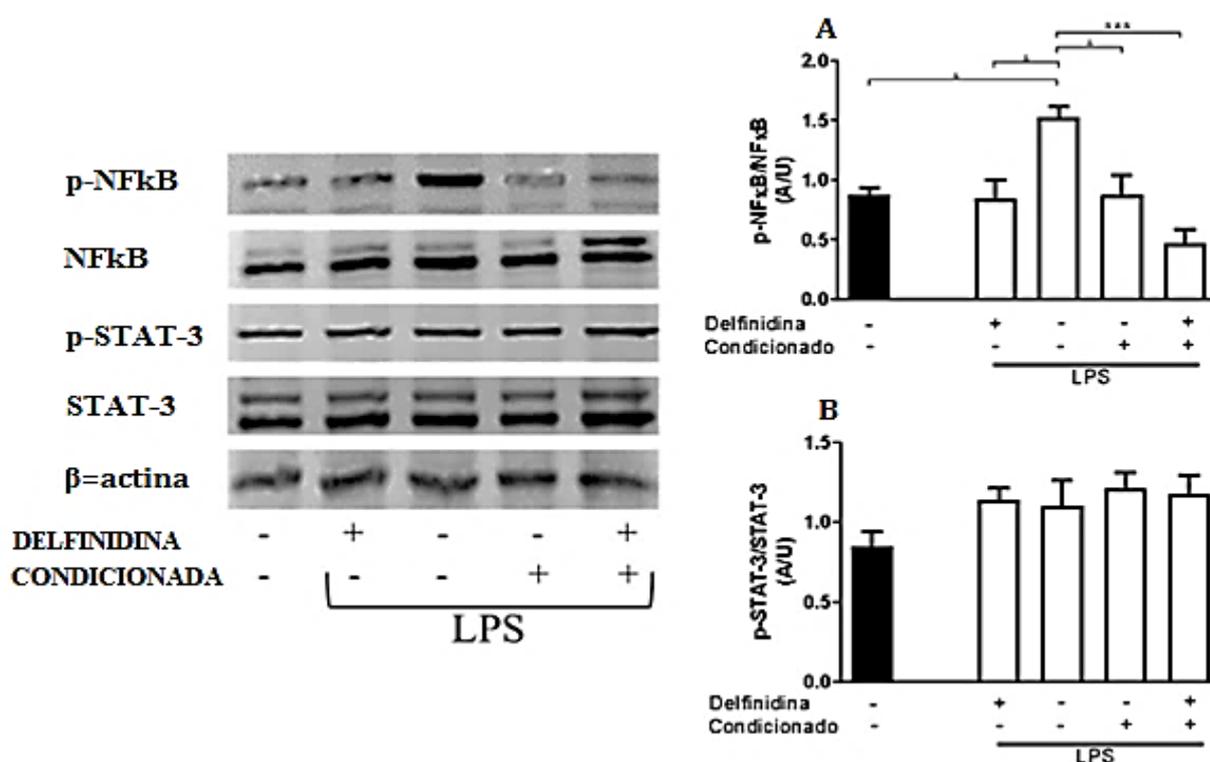


**Gráfico 6** - Resultado da produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-12, (D) IL-10 pelas Raw 264. 7. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). ( $n=5$ ,  $n$  representa o número de amostras utilizadas por grupo estudado).  $\delta\delta\delta\delta$   $p \leq 0,001$  quando comparado o grupo sem LPS com o grupo com LPS. \*  $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 5.7. EFEITO DO SOBRENADANTE DE CTMS E DELFINIDINA NA EXPRESSÃO DE NF- $\kappa$ B E STAT-3 POR RAW 264.7

Dado que NF- $\kappa$ B e STAT-3 têm papel igualmente importante na resposta inflamatória, a expressão dessas proteínas também foi avaliada nas células RAW 264.7 quando cultivadas na presença ou ausência de Delfinidina e de meio condicionado de CTMs. E os resultados mostraram que em relação a expressão da relação p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, foi observado que a Delfinidina é capaz de diminuir essa expressão, porém essa redução na expressão de p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B é mais acentuada quando as células macrofágicas são cultivadas na presença de meio condicionado obtidos de CTMs que foram tratadas com Delfinidina (Gráfico 7-A). Em relação a expressão de STAT-3/STAT-3, não obtivemos resultados estatisticamente significativos entre os grupos estudados (Gráfico 7-B).

**Gráfico 7: Resultado dos efeitos do sobrenadante de CTMs e delfinidina na expressão de NF- $\kappa$ B E STAT-3 por Raw 264.7**



**Gráfico 7** - Resultado dos efeitos do sobrenadante de CTMs e delfinidina na expressão de NF- $\kappa$ B E STAT-3 por Raw 264.7. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da expressão da razão pNF- $\kappa$ B / NF- $\kappa$ B e expressão da razão pSTAT3 / STAT3. (n=4, n representa o número de amostras utilizadas por grupo estudado). Os resultados foram representados em relação à intensidade da  $\beta$ -actina e são expressos em unidades arbitrárias. \* p  $\leq$  0,05 e \*\*\* p  $\leq$  0,001.

## 6. DISCUSSÃO

As antocianinas são compostos flavonóides, sendo bastante encontrado na forma de glicosídeos. Sendo as 6 principais, a Cianidina, Delfinidina, Malvidina, Pelargonidina, Petunidina e Peonidina, que podem ser encontradas em flores e frutos. Só a Delfinidina, pode ser encontrada em grão de feijão preto, amoras, arroz preto, uva e até milho roxo. E a ingestão de Delfinidina está associada a potenciais benefícios à saúde, como atividades antitumorais, antiaterosclerose, hipoglicemiantes, antioxidante e anti-inflamatória (SAMSØE, et al. 2019; SARI, *et al.*, 2019). A forma como a Delfinidina atua sobre as células imunes, ainda é pouco conhecido, mas alguns estudos relatam a que a posição da interação do ligante ativo e os tipos de interação entre ligante e proteína também forneceram os a energia de ligação com base na doação de um átomo de hidrogênio, mas que a interação pode ser por transferência de elétrons para os radicais livres ou quebra da estrutura da Delfinidina liberando só hidrogênios disponíveis (FANG, 2015; JUNG, *et al.*, 2017; LI, *et al.*, 2017; SARI, *et al.*, 2019).

No presente estudo, a citotoxicidade da Delfinidina sobre a CTM, foi analisada inicialmente após estimulação das células na presença e ausência de LPS. Os resultados mostraram que 50  $\mu\text{M}$  de Delfinidina com estímulo de LPS, levou à aumento na proliferação de células, sem alterar a viabilidade celular quando comparado as células cultivadas sem Delfinidina. Em conjunto com a viabilidade, o status proliferativo das CTM foi confirmado pela análise do ciclo celular, onde células cultivadas com 50  $\mu\text{M}$  de Delfinidina apresentou maior porcentagem de células nas fases do ciclo celular G2/S/M quando comparado ao controle negativo da Delfinidina (0  $\mu\text{M}$ ), mostrando efeito na proliferação dessas células com auxílio da Delfinidina. Já nas maiores concentrações testada durante os testes de padronização (100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ ) foram observadas maior taxa apoptótica, quando comparada com as células cultivadas sem a presença de Delfinidina, tanto na presença ou ausência de LPS, como previamente relatado na literatura onde efeito citotóxico em células imunes foi observado quando cultivadas em concentrações de Delfinidina acima de 100  $\mu\text{M}$  (GOSZCZ, *et al.*, 2017; HOU, *et al.*, 2005; KWON, *et al.*, 2009; TANG, *et al.*, 2015; WOODWARD, *et al.*, 2009).

Já se sabe que diversos fatores solúveis produzidos pelas CTM estão envolvidos na capacidade imunorregulatória dessas células, mas os completos mecanismos que estão envolvidos nesse processo, ainda não são bem definidos, contudo é evidente sua forte atuação

sobre o sistema imunológico inato e adaptativo (DABROWSKA, et al., 2021; KYURKCHIEV, et al., 2014; NAUTA et al., 2006).

A literatura reporta, que o microambiente em que a CTM se encontra é determinante para regular o tipo de resposta dessa célula, e quando a CTM se encontra num ambiente citotóxico, tende a ter um perfil capaz de regular o tipo de resposta imune, que pode ser mediada por diversos fatores secretados, podendo produzir citocinas inflamatórias de forma espontânea ou por indução de outras citocinas (DABROWSKA, et al., 2021; KYURKCHIEV. et al., 2014).

Dentre as citocinas de caráter pró-inflamatória, a IL-1 $\beta$  é conhecida por mediar a resposta inflamatória aguda, sendo nas CTM, essa, mais secretada que a IL-1 $\alpha$  (ABDAL DAYEM, et al 2019; VARELLA e FORTE, 2001). A indução da síntese dessas citocinas pode ser realizada pela ativação dos receptores do tipo Toll-like (TLR) e tipo NOD (NLR), que ativa posteriormente o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (BARIONI, et al., 2013; KYURKCHIEV, et al., 2014; MARTINEZ e GORDON, 2014). Dessa forma, quando observamos nossos resultados, verificamos aumento significativo dessa citocina quando as células foram estimuladas com LPS.

Contudo, as CTM também sintetizam citocinas com atuação anti-inflamatórias, inclusive de forma autócrina, como exemplo, a IL-10, fazendo feedback negativo de uma reação inflamatória (DABROWSKA, et al., 2021; KYURKCHIEV, et al., 2014; MARTINEZ e GORDON, 2014).

A IL-6, é uma citocina conhecida por sua ação pró-inflamatória, atuando em diversos mecanismos da resposta imune, inflamação, apoptose, sobrevivência celular e proliferação celular, tendo atuação sobre os monócitos, neutrófilos. Entretanto a IL-6 pode também atuar de forma anti-inflamatória, dependendo do ambiente em que se encontra e quando secretada pela CTM. Sua atuação no organismo inclui, estimular a diferenciação e secreção de células B, inibição de DC, modulação dos neutrófilos, e atua sobre células Treg e Th17 dependente de IL-6 (BARIONI, et al., 2013; KYURKCHIEV, et al., 2014; VARELLA e FORTE, 2001).

Os nossos resultados mostraram que CTMs aumentam a produção de IL-6 quando estimuladas com LPS. As CTMs ativadas *in vitro* em resposta a ativação aos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), podem aumentar a produção de IL-6, atuando principalmente no recrutamento de neutrófilos, sobrevida e aumentando sua atividade pró-

inflamatória, bem como, a ativação do receptor de IL-6 é um dos responsáveis por ativar a via de sinalização para ativação do fator de transcrição STAT3, via JAK2 devido essa ativação (BARIONI, *et al.*, 2013; BODE, *et.al*, 2012; DE OLIVEIRA, *et al.*, 2011; LE BLANC e MOUGIAKAKOS, 2012). Além disso, a produção de IL-6 pelas CTMs é induzida pela PGE<sub>2</sub>, sendo usualmente encontrada aumentada em conjunto com a PGE<sub>2</sub> e NO (BOUFFI, *et al.*, 2010).

Outro modulador imunológico importante secretado pelas CTMs é o NO, possuindo função supressora. As CTMs expressam iNOS tanto em estado quiescente, quanto ativados após estímulos de fatores inflamatórios, metabolizando L-arginina para gerar NO. O NO pode suprimir as vias da IL-2, para resultar na inibição da função das células T, da expressão de MHC-II, induzir apoptose das células T e supressão da produção de citocinas Th1 e Th2, e indução de Treg. Sendo assim a CTMs podem produzir NO em altas quantidades para supressão de uma resposta inflamatória (BERNARDO e FIBBE, 2013; BOUFFI, *et al.*, 2010; DABROWSKA, *et al.*, 2021; JIANG e XU, 2020; SU, CHEN, HUANG, *et al.*, 2014). E no presente estudo, a Delfinidina foi capaz de aumentar a produção de NO pelas CTMs.

Em vista disso, para a síntese dessas citocinas inflamatórias, além da ativação de receptores específicos, deve-se saber que é decorrente da posterior ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que é o principal regulador da expressão de vários genes envolvidos na inflamação, resposta imune e apoptose, genes esses que incluem citocinas como os da IL-1 e IL-6 (BARIONI, *et al.*, 2013; DAVERI *et al.*, 2018; YAMAMOTO e GAYNOR, 2004).

Ademais, outro fator que tem importante ação imunorregulatória é a PGE<sub>2</sub>, fator que tem a capacidade de induzir a expressão de IL-23, e conseqüentemente atuar de forma importante na produção de linfócitos Th17. Adicionalmente, a PGE<sub>2</sub> tem capacidade de modular efeitos anti-inflamatórios, como, promover a síntese de TGF- $\beta$  e induzir a geração de MDSC (células supressoras derivadas de mielóide), que podem suprimir as atividades das células NK e das células T CD8<sup>+</sup> (JIANG e XU, 2020). Entretanto, não observamos ação da Delfinidina na modulação dessa citocina.

Adicionalmente, observamos que a Delfinidina foi capaz de aumentar a síntese de IL-10, sendo esta interleucina uma das principais citocinas com ação anti-inflamatória e é intimamente envolvida no controle negativo das reações imunes, podendo atuar de forma autócrina e inibir a função das mesmas que a produziram (JIANG e XU, 2020; VARELLA e

FORTE, 2001). Adicionalmente, seu receptor é associado às quinases da família Janus (JAK1 e TYK2 (*Non-receptor tyrosine-protein kinase*)) que ativam a STAT3 e suas principais funções incluem inibir produção de citocinas inflamatórias como IL-12 que por consequência inibe a secreção de IFN- $\gamma$  e a expressão das moléculas de MHC classe II, então sua principal função é regular de forma negativa as respostas imunes, mesmo essa sendo secretada em menor quantidade durante processos inflamatórios (ABBAS, *et al.*, 2015; BODE, *et al.*, 2012).

Contudo, devemos destacar os resultados obtidos na síntese de TGF- $\beta$ , onde observamos que a Delfinidina atuou modulando aumento da produção dessa citocina. O TGF- $\beta$  possui importantes funções sobre o sistema imunitário, como a inibição da proliferação e das funções efetoras de Linfócitos T, pode promover o prosseguimento do subtipo Th17 de Linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e inibir o desenvolvimento do perfil Th1 e Th2, bem como, o TGF- $\beta$  secretado por macrófagos, pode favorecer o processo de cicatrização em tecidos danificados pelo processo inflamatório, por meio de estimulações, regulando a matriz extracelular pelos fibroblastos, promovendo a proliferação de células endoteliais para ocorrer a angiogênese, enquanto quando esta citocina se encontra em baixas concentrações, pode atuar como fator quimiotático para os monócitos, assim como induzir a secreção de IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ . Sendo o TGF- $\beta$  desempenhando o papel de controle de respostas imunes e inflamatórias, sendo este de caráter imunossupressor (JIANG e XU, 2020; SOUSA, *et al.*, 2013; PERESI, *et al.*, 2008).

Todavia, outra célula imune produtora de citocinas pró e anti-inflamatórias, são os Macrófagos, que são células plásticas, que adquirem fenótipos diferentes de acordo com o ambiente em que se encontram, se o ambiente encontra-se com invasores, rapidamente esses macrófagos ativam o fenótipo M1 (fenótipo “clássico”), devido ativação por IFN- $\gamma$  e LPS, produzindo citocinas pró-inflamatórias, promovendo principalmente respostas Th1 mediadas por IL-12, e podendo inclusive atuar de forma autócrina, para evitar um processo inflamatório exacerbado, produzindo citocinas que atuam em parte num fenótipo M2 (fenótipo “alternativo”), produtora de citocinas que atuam de forma anti-inflamatória, que possui subdivisões, como, M2a (depois de exposição a IL-13 ou IL-4), M2b (que são complexos imunes em combinação com IL-1 $\beta$  ou LPS) e M2c (após exposição a TGF- $\beta$ , IL-10 ou glicocorticóides), esses com funções de equilibrar o ambiente inflamatório, devido sua habilidade de depuração endocítica e síntese de fator trófico, resultando em diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (MARTINEZ, *et al.*, 2008; MOVAHEDI, *et al.*, 2010).

Com isso, posteriormente, foram analisados os níveis de algumas citocinas secretadas pelos macrófagos da linhagem Raw 264.7 e observamos ação direta da Delfinidina em modular negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias. As citocinas produzidas pelos macrófagos, fazem parte da imunidade inata, e podem muitas vezes atuar de forma parácrina, ou de forma autócrina para uma explosão de citocinas, em infecções mais graves. As citocinas produzidas pelos macrófagos podem ativar a cascata inflamatória, promovendo a resposta das células T, sendo TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , as citocinas pró-inflamatórias que são rapidamente secretadas pelos macrófagos (BERNARDO e, FIBBE, 2013; JIANG e XU, 2020; VARELLA e FORTE, 2001). O TNF- $\alpha$  foi uma das citocinas avaliadas, que possui ação inflamatória, sendo a principal secretada por macrófagos, e que está presente em altas doses em algumas situações como síndrome metabólica, na obesidade humana, devido a inflamação presente nos tecido adiposo. No presente estudo, houve diminuição na sua síntese. Resultado este que vai de acordo com outro estudo que mostra diminuição da síntese de TNF- $\alpha$  pela Delfinidina pela interação direta com o receptor de TNF- $\alpha$ , impedindo a interação do receptor com a proteína TNF- $\alpha$  (SARI, *et al.*, 2019).

Adicionalmente observamos que o meio condicionado de CTMs, principalmente no meio proveniente de CTMS cultivadas com Delfinidina, apresentaram maior potencialidade de diminuir a produção de citocinas pro-inflamatórias. Interessantemente, em relação a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (JIANG e XU, 2020; VARELLA e FORTE, 2001), observamos que sua produção aumenta quando comparada com demais grupos avaliados nesse estudo.

Macrófagos são importantes no controle da inflamação, pois podem mudar seu perfil inflamatório de acordo com o microambiente em que se encontram, e as CTMs possuem efeito imunorregulador sobre esse fenótipo, sendo capazes de atenuar a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, e estimular a síntese de citocinas anti-inflamatória, como IL-10, e o TGF- $\beta$  (BERNARDO e, FIBBE, 2013; MANTOVANI, *et al.*, 2013; VARELLA e FORTE, 2001). Adicionalmente, em concordância com nossos achados, a literatura relata que CTMs são capazes de promover o fenótipo M2 nos macrófagos (EGGENHOFER e HOOGDUIJN, 2012).

As células imunes são capazes de reconhecer patógenos, por meio dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) que detectam os PAMP, como o LPS de bactérias Gram-negativas. Assim, quando macrófagos são ativados por LPS, além de liberação de citocinas pró-inflamatória, ocorre a síntese de IL-10, seguido de indução da ativação sustentada pelo

transdutor de sinal e ativador da transcrição STAT-3, é também realizado o mecanismo de *feedback* negativo, de forma a regular a resposta inflamatória (ALDAPA-VEGA, *et al.*, 2016; BARIONI, *et al.*, 2013; BODE, *et al.*, 2012; MURDOCK e NÚÑEZ, 2016).

Desse modo, o uso de LPS neste estudo é de suma importância pois o LPS é uma molécula altamente imunogênica encontrada na membrana externa de bactérias gram-negativas, sendo reconhecida por receptores do tipo *Toll*, que uma vez ativados culminam com a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, o NF- $\kappa$ B (BARIONI, *et al.*, 2013; AKIRA e TAKEDA, 2004; ALDAPA-VEGA, *et al.*, 2016; MALDONADO *et al.*, 2016; MURDOCK e NÚÑEZ, 2016). Fator de transcrição esse, o principal regulador da expressão de vários genes envolvidos na inflamação, resposta imune e apoptose, bem como a possibilidade de sua ativação estar envolvida também na resposta ao estresse, pois é espontaneamente encontrado ativado por diversos estímulos (YAMAMOTO e GAYNOR, 2004). Em relação aos nossos achados, foi observado que a Delfinidina foi capaz de atenuar a expressão da relação p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pelas CTMs. Semelhantemente, esses resultados também foram observados na avaliação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B pelos macrófagos, onde foi observado diminuição de sua expressão. Que vai de acordo com outros estudos onde a Delfinidina atenua a expressão do fatores de transcrição NF- $\kappa$ B sobre algumas células, como endoteliais e condrócitos (CHEN, *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2020).

Em contraste com os fatores de transcrição de ação pró-inflamatória, temos o fator de transcrição STAT-3, que se mantém de forma inativa no citoplasma de células não estimuladas, e sua ativação é mediada pelo ativador JAK1 (VILLARINO, *et al.*, 2015). Todavia neste estudo não obtivemos diferenças em sua expressão na expressão, em ambas células. E a STAT-3 é um fator de transcrição que possui acetilação reversível que afeta a família do NF- $\kappa$ B, tendo então, o papel de modular o efeito de NF- $\kappa$ B em resposta a inflamação e produção de citocinas envolvidas no processo, aumentando principalmente citocinas anti-inflamatória como IL-10 (CHEN, *et al.*, 2011; DAVERI *et al.*, 2018; GRIVENNIKOV e KARIN, 2010).

## **7. CONCLUSÃO**

O presente estudo mostrou que a Delfinidina aumentou a capacidade imunorregulatória da Célula-Tronco Mesenquimal sob os macrófagos, célula esta, importante na imunidade inata.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K *et al.* **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier, 8ª ed. 2015
- Abdal Dayem A, *et al.* Production of Mesenchymal Stem Cells Through Stem Cell Reprogramming. **Int. J. Mol. Sci.** 2019, 20(8)
- Afanasyev B.V., *et al.* founder of the mesenchymal stem cell concept. **Cell Ther Transplant**, 2009 Jun; Vol. 1, No. 3
- Akira, S. and Takeda, K. Toll like receptor signalling. **Nature reviews immunology**. 2004, v.4, p.499-511.
- Aldapa-Vega, G., *et al.* Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. **Rev Alerg Mex.** 2016 Jul-Sep;63(3):293-302.
- Ali, G., *et al.* Nitric oxide augments mesenchymal stem cell ability to repair liver fibrosis. **J Transl Med** 2012, 10, 75.
- Augello A., *et al.* Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. **Eur J Immunol.** 2005 May;35(5):1482-90.
- Baiguera S., *et al.* Mesenchymal stromal cells for tissue-engineerR&D tissue and organ replacements. **Transpl Int.** 2012 Apr;25(4):369-82
- Barioni, E. D., *et al.* Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. Hydroalcoholic Extract Inhibits Neutrophil Functions Related to Innate Host Defense. **Evidence-based complementary and alternative medicine:** 2013, 787916.
- Batsali A.K., *et al.* The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) in Normal and Abnormal Hematopoiesis and Their Therapeutic Potential. **J. Clin. Med.** 2020, 9, 856
- Bernardo M.E. and Fibbe W.E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell** 13, October 3, 2013 <sup>a</sup>2013 Elsevier Inc
- Bianco P., *et al.* "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. **Hum Gene Ther;** 2010, 21(9):1057-66.
- Bode, J.G., Ehling, C., Häussinger, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. **Cellular Signalling.** 2012, v. 24, n. 6, p.1185-1194.
- Bouffi C. *et al.* IL-6-Dependent PGE2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells Inhibits Local Inflammation in Experimental Arthritis. **PLoS ONE** 5(12): e14247. December 2010, Volume 5, Issue 12.
- Butler J.T., Abdelhamed S., Kurre P. Extracellular vesicles in the hematopoietic microenvironment. **Haematologica.** 2018; 103:382–394

Chen, C., *et al.* Inhibitory Effect of Delphinidin on Monocyte–Endothelial Cell Adhesion Induced by Oxidized Low-Density Lipoprotein via ROS/p38MAPK/NF- $\kappa$ B Pathway. **Cell Biochem Biophys** 2011, 61, 337–348.

Chen L., *et al.* Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS One**.2008, 2;3(4): e1886.

Chen J., *et al.* Delphinidin protects  $\beta$ 2m<sup>-</sup>/Thy1<sup>+</sup> bone marrow-derived hepatocyte stem cells against TGF- $\beta$ 1-induced oxidative stress and apoptosis through the PI3K/Akt pathway in vitro. **Chemico-Biological Interactions** 297 (2019) 109–118

Corcione A., *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**. 2006, 1;107(1):367-72.

Dabrowska, S., *et al.* Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. **Front. Immunol.**, 05 February 2021

Da Silva Meirelles L., Caplan A.I., Nardi N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. 2008 Sep;26(9):2287-99

Dávalos A., *et al.* Effects of R&D grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. **Br J Nutr**. 2009 Oct;102(8):1125-35.

Daveri., *et al.* Cyanidin and delphinidin modulate inflammation and alter R&D R&Dox signaling improving insulin resistance in high fat-fed mice. **R&Dox Biol**. 2018 Sep; 18:16-24.

Dayoub., Andriantsitohaina R., Clere N. Pleiotropic beneficial effects of epigallocatechin gallate, quercetin and delphinidin on cardiovascular diseases associated with endothelial dysfunction. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**. 2013 Dec;11(4):249-64.

Dayoub., *et al.* Estrogen receptor  $\alpha$ /HDAC/NFAT axis for delphinidin effects on proliferation and differentiation of T lymphocytes from patients with cardiovascular risks. **Sci Rep**. 2017 Aug 24;7(1):9378.

Dazzi F., Lopes L., Weng L. Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'? **Immunology**; 2012, 137(3):206-13.

De Luca L., *et al.* Mirnas and piRNAs from bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles induce cell survival and inhibit cell differentiation of cord blood hematopoietic stem cells: A new insight in transplantation. **Oncotarget**. 2016; 7:6676–6692.

De Oliveira C.M.B. *et al.* Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia** 2011 Mar, Vol. 61, Nº 2.

Dominici M., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, 2006; 8, 315–317.

Dos Santos G. G., *et al.* The influence of protein malnutrition on biological and immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells. **Clin Nutr.** 2017 Aug;36(4):1149-1157

Duffy M.M., *et al.* Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. **Eur J Immunol**;2011, 41(10):2840-51.

Eggenhofer, E. and Hoogduijn, M.J. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. **Transplant Res** 2012, 1, 12.

English K., *et al.* Cellular contact, prostaglandin E (2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in the induction of human mesenchymal stem cells from P3 + CD4 + CD25 (High) regulatory T cells. **Clin Exp Immunol** 2009; 156: 149-160.

Fang J. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. **Nutrition.** 2015; 31 (11-12): 1301-1306.

Friedenstein A.J.; Gorskaja J.F.; Kulagina N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, 1976, v. 4, n. 5, p. 267-74.

Fock. R. A. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação do receptor de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NFκB** [thesis]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2005

Gao, F., *et al.* Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. **Cell death & disease**, 2016, 7(1), e2062.

García-García, A., de Castillejo, C. L., and Méndez-Ferrer, S. BMSCs and hematopoiesis. **Immunology letters**, 2015, 168(2), 129–135.

Gebler, A., Zabel, O., and Seliger, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in molecular medicine**, 2012; 18(2), 128–134.

Glenn J.D., *et al.* Mesenchymal stem cells differentially modulate effector CD8+ T cell subsets and exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. **Stem Cells**; 2014, 32(10):2744-55.

Griffin M.D., Ritter T., Mahon B.P. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. **Hum Gene Ther.** 2010 Dec;21(12):1641-55

Grivennikov, S. I. and Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, 2010, 21(1), 11–19.

Goszcz, *et al.* Bioavailable Concentrations of Delphinidin and Its Metabolite, Gallic Acid, Induce Antioxidant Protection Associated with Increased Intracellular Glutathione in Cultured Endothelial Cells. **Hindawi, Oxidative Medicine and Cellular Longevity** Volume 2017, Article ID 9260701

Gurrea M.L.L.C., *et al.* Cocoa and Grape Seed Byproducts as a Source of Antioxidant and Anti-Inflammatory Proanthocyanidins. **Int. J. Mol. Sci.** 2017, 18, 376

Hafeez B.B., *et al.* Delphinidin, a dietary anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables - A new weapon to blunt prostate cancer growth. **Cell Cycle** 2008 Nov, 7:21, 3320-3326.

Hocking A.M., Gibran N.S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Exp Cell Res.** 2010, 15;316(14):2213-9.

Hoogduijn M. J. Are mesenchymal stromal cells immune cells?. **Arthritis research & therapy**, 2015, 17(1), 88.

Hou, *et al.* Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. **Biochemical Pharmacology**. Volume 70, Issue 3, 1 August 2005, Pages 417-425

Hyun K.H., *et al.* Delphinidin Chloride and Its Hydrolytic Metabolite Gallic Acid Promote Differentiation of Regulatory T cells and Have an Anti-inflammatory Effect on the Allograft Model. **Journal of Food Science** 2019, Vol. 84, Iss. 4.

Jalnapurkar, S., *et al.* Microvesicles Secreted by Nitric Oxide-Primed Mesenchymal Stromal Cells Boost the Engraftment Potential of Hematopoietic Stem Cells. **Stem cells**; 2019, 37:128–138.

Jiang W. and Xu J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**. 2020, 53: e12712.

Jin X, *et al.* Delphinidin-3-Glucoside Protects against Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Mitochondrial Dysfunction in Vascular Endothelial Cells via the Sodium-Dependent Glucose Transporter SGLT1. **PLOS ONE** 2014, 9(1): 10.1371.

Jung H., *et al.* Involvement of PTP-RQ in differentiation during adipogenesis of human mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2009 May 29;383(2):252-7.

Jung T.D., *et al.* Comparative analysis of  $\gamma$ -oryzanol,  $\beta$ -glucan, total phenolic content and antioxidant activity in fermented rice bran of different varieties. **Nutrients**. 2017;9(6):1–12.

Kassem M. and Abdallah B.M. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. **Cell Tissue Res**. 2008 Jan;331(1):157-63.

Kong J.M., *et al.* **Analysis and biological activities of anthocyanins**. Phytochemistry, Volume 69, Issue 9, June 2008, Pages 1939-1940

Krampera M., *et al.* Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells** 2006; 24: 386–398.

Krstic A., *et al.* The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. **Immunol Res.** 2012, 52(1-2):34-41.

Kuroda Y., *et al.* Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010, 11;107(19):8639-43.

Kyurkchiev D *et al.* Mesenchymal stem cells secrete immunoregulatory cytokines. **World J Stem Cells** 2014, 6(5): 552-570

Kwon J.Y., *et al.* Delphinidin suppresses ultraviolet B-induced cyclooxygenases-2 expression through inhibition of MAPKK4 and PI-3 kinase. **Carcinogenesis** 2009, vol.30 no.11 pp.1932–1940.

Lee B.C. and Yu K.R. Impact of mesenchymal stem cell senescence on inflammaging. **BMB Rep.** 2020; 53(2): 65-73

Lee D. K. and Song S.U. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Cell Immunol.** 2018 Apr;326:68-76

Lee D.Y., *et al.* Efeitos citoprotetores da delphinidina para condrócitos humanos contra o estresse oxidativo através da ativação da autofagia. **Antioxidantes.** 2020; 9(1):83.

Le Blanc, K. and Mougiakakos, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nat Rev Immunol** 2012, 12, 383–396.

Li D., *et al.* Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** 2017;57(8):1729–17741.

Li H., *et al.* Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering. **Stem Cells Int.** 2019 Jan 13; 2019: 9671206.

Li, X., *et al.* IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. **Stem Cell Res Ther** 2019, 10, 18.

Lima, F.S., *et al.* Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine modelo of protein malnutrition. **European Journal of Nutrition**, 2013, v.52, n.4, p.1343-1351.

Lopes *et al.* Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **R. Bras. Agrociência**, 2007 Set, v.13, n.3, p. 291-297.

Maldonado, R.F., *et al.* Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEM Microbiology Reviews.** 2016, v.40, n.4, p.480-493.

Mantovani A. *et al.* Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J Pathol** 2013, 229: 176 –185

Martinez F.O., *et al.* Macrophage activation and polarization. **Front Biosci.** 2008, 13:453-61.

Martinez, F.O. and Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports.** 2014, v.6, n.13, p.1-13.

Mennan, C., *et al.* A comprehensive characterisation of large-scale expanded human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells. **Stem cell research e therapy**, 2019, 10(1), 99.

Moriwaki., *et al.* Delphinidin, One of the Major Anthocyanidins, Prevents Bone Loss through the Inhibition of Excessive Osteoclastogenesis in Osteoporosis Model Mice. **PLOS ONE** May 2014, Vol 9, Issue 5, e97177.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63

Movahedi K., *et al.* Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. **Cancer Res**. 2010, 70: 5728-39.

Murdock, J.L. and Núñez, G. TLR4: The Winding Road to the Discovery of the LPS Receptor. **J Immunol**, Oct 2016, 197 (7) 2561-2562;

Najar M., *et al.* Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. **Cell Immunol**. 2010, 264(2):171-9.

Nauta A.J., *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ derived and monocyte-derived dendritic cells. **J Immunol**, 2006, v. 177, n. 4, p. 2080-7.

Oh Y.S., *et al.* Characterization and quantification of anthocyanins in grape juices obtained from the grapes cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. **J Food Sci**. 2008 Jun;73(5):C378-89

Oliveira L.F. **Avaliação de célula tronco mesenquimais de medula óssea de ratos normotensos wistar-kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR)**. Dissertação Patologia Clínica, Universidade Federal do Triângulo mineiro, Uberaba, 2010.

Peresi E., *et al.* Cytokines and acute phase serum proteins as markers of inflammatory regression during the treatment of pulmonary tuberculosis. **J Bras Pneumol**. 2008, 34(11):942-949

Prevosto C., *et al.* Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. **Haematologica**. 2007, 92 (7):881-8.

Rasmusson I., *et al.* Mesenchymal Stem Cells Stimulate Antibody Secretion in Human B Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**. 2007 Mar; 65, 336–343

Rodriguez, L.A., *et al.* Preconditioning in an Inflammatory Milieu Augments the Immunotherapeutic Function of Mesenchymal Stromal Cells. **Cells**, 2019, 8, 462

Samsøe, D.N.B., *et al.* Interplay between food and gut microbiota in health and disease. **Food Research International** 115 (2019) 23–31 24

Santos, E.J.C., *et al.* Mesenchymal stem cells in the treatment of coronavirus-induced pneumonia (COVID-19). **Rev Med**, 2020 maio-jun;99(3):272-7

Sari, D.R.T., *et al.* Virtual Prediction of the Delphinidin-3-O-glucoside and Peonidin-3-O-glucoside as Anti-inflammatory of TNF- $\alpha$  Signaling. **Acta inform med.** 2019 sep 27(3): 152-157

Saulitea L., *et al.* Effects of malvidin, cyanidin and delphinidin on human adipose mesenchymal stem cell differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. **Phytomedicine** 53, 2019, 86–95

Silva L.B.A.R., *et al.* Bioactive food compounds, epigenetics and chronic disease prevention: Focus on early-life interventions with polyphenols. **Food Research International** 125, 2019, 108646

Shi Y., *et al.* Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell Res.** 2010 May;20(5):510-8.

Sogo., *et al.* Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin. **Biofactors.** 2015 Jan-Feb;41(1):58-65.

Sousa J.R., *et al.* Imunoexpressão de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  em lesões de pacientes nas diversas formas clínicas da hanseníase por meio da técnica de imunohistoquímica. **Rev Pan-Amaz Saude** 2013; 4(2):45-53

Su J., Chen X., Huang Y. *et al.* Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. **Cell Death Differ** 2014, 21, 388–396.

Suzuki R., *et al.* Blueberry extracts enriched with anthocyanidins inhibit the differentiation of 3t3-l1 adipocytes through the insulin pathway. **Nutr. Metab.** 2011, vol 8, pp. 1 – 9

Tang J., *et al.* **Delphinidin and cyanidin exhibit antiproliferative and apoptotic effects in MCF7 human breast cancer cells.** (2015) Integr Cancer Sci Therap. 2: DOI: 10.15761/ICST.1000119

Terci D.B.L., Rossi A.V. **Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?.** Quim. Nova, 2002, Vol. 25, No. 4, 684-688.

Timari H., *et al.* The effect of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on hematopoietic stem cells fate. **Adv. Pharm. Bull.** 2017; 7:531–546.

Traggiati E., *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. **Stem Cells.** 2008 Feb;26(2):562-9.

Ulivi V., *et al.* Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype. **Stem Cells Dev.** 2014 Aug 15;23(16):1858-69.

Varella P.V., Forte W.C.N. Citokines: a review. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 2001; 24(4):146-154

Villarino A.V., *et al.* Mechanism of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease. **J Immunol**, 2015 Jan, v. 194, n. 1, p. 21-27.

Wang, S., Qu X., Zhao R.C. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **J Hematol Oncol**, 2012, 5:19.

Wang Y., *et al.* Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature Immunology**, 2014, volume 15, pages 1009–1016.

Watabe T., Miyazono K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. **Cell Res.** 2009 Jan; 19(1):103-15.

Watson R.R., Schonlau F. Nutraceutical and antioxidant effects of a delphinidin-rich maqui berry extract Delphinol®: a review. **Minerva Cardioangiol.** 2015 Apr;63(2 Suppl 1):1-12.

Weiss, A.R.R. e Dahlke, M.H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. **Front. Immunol.** 2019, Vol 10, article 1191

Woodward G., *et al.* Anthocyanin Stability and Recovery: Implications for the Analysis of Clinical and Experimental Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57 (12), 5271-5278

Yamamoto Y. and Gaynor R.B. I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway. **Trends Biochem Sci**, 2004 Feb, Vol.29 No.2

Yang R., *et al.* A subset of IL-17(+) mesenchymal stem cells possesses anti-Candida albicans effect. **Cell Res.** 2013 Jan;23(1):107-21

Yao, X., *et al.* Nitric oxide releasing hydrogel enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for myocardial infarction. **Biomaterials**, 2015, 60,130–140.

You Y., *et al.* Mulberry and mulberry wine extract increase the number of mitochondria during brown adipogenesis. **Food Funct.** 2015 Feb;6(2):401-8

## ANEXO A

### HISTÓRICO

**9136 - 11475161 / 1 - Bruna Roberta Oliveira Neves**

**Email:** brunaron@usp.br  
**Data de Nascimento:** 14/11/1995  
**Cédula de Identidade:** RG - 43.480.234-7 - SP  
**Local de Nascimento:** Estado de São Paulo  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharela em Biomedicina - Universidade de Santo Amaro - São Paulo - Brasil - 2019

**Curso:** Mestrado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Análises Clínicas  
**Data de Matrícula:** 12/07/2019  
**Início da Contagem de Prazo:** 12/07/2019  
**Data Limite para o Depósito:** 12/01/2022  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 12/07/2019 até o presente Email: hemato@usp.br  
**Proficiência em Línguas:**  
 Inglês, Aprovado em 12/07/2019  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 13/01/2021

**Data do Depósito do Trabalho:** 28/10/2021  
**Título do Trabalho:** "Influência da Delfinidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória das Células Tronco Mesenquimais"  
**Data Máxima para Aprovação da Banca:** 13/12/2021  
**Data de Aprovação da Banca:** 10/11/2021  
**Data Máxima para Defesa:** 23/02/2022  
**Data da Defesa:** 08/02/2022  
**Resultado da Defesa:** Aprovado

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 19/07/2021

Impresso em: 18/02/2022 11:50:41

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**FICHA DO ALUNO**

9136 - 11475161/1 - Bruna Roberta Oliveira Neves

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICB5726-2/1	Imunodeficiências Primárias e Doenças Autoinflamatórias (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/08/2019	04/09/2019	120	8	100	B	N	Concluída
MPT5794-2/3	Ultraestrutura e Função Celular (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/08/2019	04/09/2019	75	5	100	A	N	Concluída
ICB5772-1/1	Fundamentos de Metodologias Biomédicas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	02/08/2019	29/11/2019	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5702-11/1	Bases Moleculares das Funções Celulares (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/08/2019	20/10/2019	150	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5805-2/7	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	20/08/2019	28/10/2019	90	6	100	A	N	Concluída
MCM5926-1/3	Células e Moléculas da Resposta Imune Inata (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	23/09/2019	06/10/2019	60	4	100	A	N	Concluída

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-14/3	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	10/03/2020	23/06/2020	15	1	100	A	N	Concluída
VPS5717-8/1	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	16/03/2020	06/04/2020	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-4/9	Aprimoramento Pedagógico	17/03/2020	13/04/2020	60	0	-	-	N	Turma cancelada
PSC5964-5/2	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	03/08/2020	13/09/2020	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/5	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	14/08/2020	26/11/2020	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5719-4/3	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	14/08/2020	04/12/2020	90	6	94	A	N	Concluída
6045818-16/2	Fundamentos da Prática Docente no Ensino Superior (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	14/09/2020	30/11/2020	60	4	100	A	N	Concluída
MPT5760-5/5	Metodologia de Ensino I: Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	13/10/2020	14/12/2020	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
RPA5741-5/1	Patologia Oncológica e Molecular I (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	26/03/2021	08/07/2021	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
8035809-1/2	Biologia e Função das Células-Tronco em Tecidos Normais e Neoplásicos (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	07/04/2021	19/05/2021	60	4	85	A	N	Concluída
FBC5755-4/1	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	14/04/2021	18/05/2021	30	0	-	-	N	Turma cancelada
DPG5009-1/1	Docência do Ensino Superior: Práticas, Renovação Pedagógica e Memórias (Pró-Reitoria de Pós-Graduação - Universidade de São Paulo)	20/09/2021	28/11/2021	30	0	-	-	N	Aguardando avaliação

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
<b>Disciplinas:</b>	0	25	41
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	25	41

**Créditos Atribuídos à Dissertação:** 71

**Observações:**

1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Comissão julgadora da dissertação de mestrado:**

NUSP	Nome	Vínculo	Função
3401906	Ricardo Ambrosio Fock	FCF - USP	Presidente
1832188	Thomas Prates Ong	FCF - USP	
6896495	Isabel Daufenback Machado	FURB - Externo	
9474051	Paula Schmidt Azevedo Gaiolla	FM-UNESP - Externo	

**Este documento eletrônico dispensa carimbo e assinatura. Sua autenticidade pode ser comprovada fornecendo-se o código de controle na seguinte página da Universidade de São Paulo: <https://uspdigital.usp.br/iddigital>**

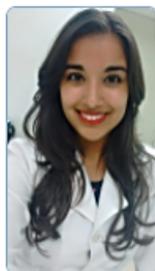
Documento emitido às 11:54:10 horas do dia 18/02/2022 (hora e data de Brasília)

Código de controle: SFA6-VF8G-MNS2-9SAF

Código de controle válido até: 18/03/2022

## ANEXO B

### CURRICULO LATTES



#### Bruna Roberta Oliveira Neves

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7574733965602123>

ID Lattes: **7574733965602123**

Última atualização do currículo em 12/10/2021

Biomédica formada pela Universidade Santo Amaro -UNISA (2018) e técnica em Análises Clínicas (2014). Tem Participação em inúmeros projetos da extensão universitária da Universidade Santo Amaro e pelo Projeto RONDON/SP, e foi responsável pela organização de Palestras em Escolas Estaduais sobre Drogas e IST's. Atualmente é aluna mestranda do Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP acerca dos efeitos da Delfinidina sobre a ação imunorregulatória das Células-Tronco Mesenquimais **(Texto informado pelo autor)**

#### Identificação

Nome Bruna Roberta Oliveira Neves

Nome em citações bibliográficas NEVES, B. R. O.

Lattes iD <http://lattes.cnpq.br/7574733965602123>

#### Endereço

#### Formação acadêmica/titulação

- 2019** Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7).  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.  
Título: Influência da delfinidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória das células tronco mesenquimais, Orientador: Ricardo Ambrósio Fock.  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2015 - 2018** Graduação em Biomedicina.  
Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.  
Título: A IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO COMPLEMENTAR NA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.  
Orientador: Profa. Dra. Maria Regina de Azevedo.  
Bolsista do(a): Programa Universidade Para Todos, PROUNI, Brasil.
- 2013 - 2014** Curso técnico/profissionalizante em Análises Clínicas.  
Colégio Inaci, INACI, Brasil.  
Bolsista do(a): Programa Vence, VENCE, Brasil.

## Formação Complementar

---

- 2020 - 2020** Extensão universitária em Aprendendo conceitos da formação em saúde em meio a pandemia de Covid-19. (Carga horária: 30h).  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.
- 2020 - 2020** Alimentos Funcionais. (Carga horária: 4h).  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Brasil.
- 2020 - 2020** Medidas de proteção no manejo da COVID-19 na Atenção Especializada. (Carga horária: 15h).  
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil.
- 2019 - 2019** Extensão universitária em Operação Itapeva - 11. (Carga horária: 84h).  
Projeto RONDON/SP, RONDON, Brasil.
- 2018 - 2018** Extensão universitária em Operação Itapeva 09. (Carga horária: 102h).  
Projeto RONDON/SP, RONDON, Brasil.
- 2018 - 2018** Extensão universitária em Operação Nova Campina 02. (Carga horária: 84h).  
Projeto RONDON/SP, RONDON, Brasil.
- 2018 - 2018** Primeiros Socorros. (Carga horária: 8h).  
Universidade Santo Amaro, UNISA, Brasil.
- 2017 - 2017** Extensão universitária em XV Ação Social do Parque Estadual da Ilha do Cardoso. (Carga horária: 40h).  
Universidade Santo Amaro, UNISA, Brasil.
- 2017 - 2017** Extensão universitária em PROJETO RONDON-SP-APIAÍ 01. (Carga horária: 70h).  
Projeto RONDON/SP, RONDON, Brasil.
- 2017 - 2017** Extensão universitária em Operação Itapeva 08 - Rondon50. (Carga horária: 102h).  
Projeto RONDON/SP, RONDON, Brasil.
- 2016 - 2016** Extensão universitária em XIV Ação Social do Parque Estadual Ilha do Cardoso. (Carga horária: 40h).  
Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.
- 2016 - 2016** Citogenética Humana (Clássica e Molecular) no Diagnóstico de Doença. (Carga horária: 4h).  
Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.
- 2015 - 2015** Anatomia Patológica e técnicas de Imuno-histoquímica. (Carga horária: 3h).  
Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.
- 2015 - 2015** Capacitação de Coleta Venosa e Interferentes pré-analíticos na Gasometria. (Carga horária: 3h).  
Universidade Santo Amaro, UNISA, Brasil.

## Atuação Profissional

### Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

#### Vínculo institucional

2019 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluna de mestrado, Regime: Dedicção exclusiva.

### Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil.

#### Vínculo institucional

2021 - 2021 Vínculo: Monitora Voluntária, Enquadramento Funcional: Voluntária, Carga horária: 6

## Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Análises Clínicas.

## Idiomas

**Inglês** Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

## Produções

### Produção bibliográfica

#### Apresentações de Trabalho

1. ★ NEVES, B. R. O.. Células Tronco Mesenquimais e suas aplicações. 2021. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
2. NEVES, B. R. O.; Silva, E.C.; Yazaki, L.G.; Loureiro, F. A. ; Yamamoto, D. . CAPACITAÇÃO DE PROFESSORES E AGENTES COMUNITÁRIOS DE SAÚDE DE NOVA CAMPINA (SP) PARA A PREVENÇÃO DE INFECÇÃO SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL E GRAVIDEZ NA ADOLESCÊNCIA. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. NEVES, B. R. O.; SAITO, B. O. S.; Cruz, M. L. . Ciclo de Palestras sobre Drogas e DST's - Relato de experiência. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. RODRIGUES, C. L.; NEVES, B. R. O. ; MEZA, A. ; Pereira, NS ; SANTOS, U. S. ; SOUZA, F. M. . Conhecimento sobre o Risco de Doenças Sexualmente Transmissíveis entre os universitários da área da saúde.. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

### Produção técnica

#### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. NEVES, B. R. O.; GONCALVES, C. E. S. . Células Tronco: Hematopoética e Mesenquimal.. 2021. (Programa de rádio ou TV/Outra).

### Demais tipos de produção técnica

1. NEVES, B. R. O.. Capacitação sobre Drogas e IST's. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

## Eventos

**Participação em eventos, congressos, exposições e feiras**

1. 21º Congresso de Iniciação Científica, 15ª Mostra de Pós-Graduação e 4º Encontro PIBID. CAPACITAÇÃO DE PROFESSORES E AGENTES COMUNITÁRIOS DE SAÚDE DE NOVA CAMPINA (SP) PARA A PREVENÇÃO DE INFECÇÃO SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL E GRAVIDEZ NA ADOLESCÊNCIA. 2018. (Congresso).
2. 20º CONGRESSO INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14º MOSTRA DE PÓS-GRADUAÇÃO 3º ENCONTRO PIBID. CONHECIMENTO SOBRE O RISCO DE DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS ENTRE OS UNIVERSITÁRIOS DA ÁREA DA SAÚDE. 2017. (Congresso).
3. 20º CONGRESSO INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14º MOSTRA DE PÓS-GRADUAÇÃO 3º ENCONTRO PIBID. CICLO DE PALESTRAS SOBRE DROGAS E DST'S RELATO DE EXPERIÊNCIA. 2017. (Congresso).
4. I Simpósio de Oncologia - FMU. 2017. (Simpósio).
5. XXXIII SEMANA ACADÊMICA DA BIOMEDICINA DA UNIVERSIDADE SANTO AMAROS. 2016. (Outra).
6. 18º Congresso de Iniciação Científica e 12ª Mostra de Pós Graduação. 2015. (Congresso).
7. I SIMPÓSIO ACADÊMICO DE TIREOIDE DO ESTADO DE SÃO PAULO LO. 2015. (Simpósio).
8. XXXI Semana acadêmica de Biomedicina - UNISA. 2015. (Outra).

**Organização de eventos, congressos, exposições e feiras**

1. NEVES, B. R. O.. II Ciclo de Palestra da FisiTox. 2021. (Outro).
2. NEVES, B. R. O.. Ciclo de Palestras FisiTox. 2020. (Outro).
3. NEVES, B. R. O.. IV Ciclo de palestras sobre Drogas e IST's. 2019. (Outro).
4. NEVES, B. R. O.; Cruz, M. L. . 19º Congresso de Iniciação Científica, 13ª Mostra de Pós-Graduação e 2º encontro PIBID. 2016. (Congresso).