UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Influência da prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre alguns aspectos
imunorregulatórios das células-tronco mesenquimais

Andressa Cristina Antunes Santos

Dissertação para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Influência da prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre alguns aspectos
imunorregulatórios das células-tronco mesenquimais

Andressa Cristina Antunes Santos

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2020

Andressa Cristina Antunes Santos

Influência da prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre alguns aspectos
imunorregulatórios das células-tronco mesenquimais

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
Orientador/presidente

Dr^a Denise Carvalho Rezende

Prof^a. Dr^a. Eliana Hiromi Akamine

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins

São Paulo, 02 de Julho de 2020

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 pela 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

S237i Santos, Andressa Cristina Antunes
Influência da prostaglandina F_{2α} sobre alguns aspectos imunorregulatórios das células-tronco mesenquimais. / Andressa Cristina Antunes Santos. -- São Paulo, 2020.
90p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Imunorregulação. 3. Prostaglandina F₂ alfa. 4. Citocinas. 5. Meio condicionado. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

"Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes."

Leonardo da Vinci

DEDICATÓRIA

*À Deus, primeiramente,
sem o qual nada seria possível!*

*Ao meu marido Lucas,
companheiro de todas as horas, que sempre
me incentivou, compreendeu minhas ausências
e pelo apoio incondicional.*

*Aos meus pais Nelson e Sílvia,
por sempre me incentivarem a encarar novos
desafios e acreditarem na minha capacidade.*

*Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock,
orientador deste trabalho,
meu especial agradecimento pela confiança,
pelo profissionalismo, pelos ensinamentos
e por ter contribuído à minha formação.*

AGRADECIMENTOS

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 Análises Clínicas da FCF-USP.

À Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

À Talita Sartori, amiga e Doutoranda do laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pela ajuda e contribuição ao longo desse trabalho, pela amizade, bom humor, além do companheirismo em todos os momentos.

À Gabriela Kodja e Renaira Oliveira, amigas e Mestrandas do laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, por deixarem meus dias no laboratório mais alegres e leves.

Aos companheiros de pós-graduação do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, Agatha Castelhana, Araceli Hastreiter, Beatriz Batista, Bruna Roberta Neves, Carolina Dias, Fabiana Lima, Juliana Casagrande e Luciene Assaf, pelo aprendizado diário.

Aos estagiários e colegas de trabalho.

À Renata Albuquerque e ao Edson Makiyama, pela amizade e auxílio técnico.

Ao apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq sem o qual este trabalho não poderia ter sido executado.

RESUMO

SANTOS, A.C.A. **Influência da prostaglandina $F_{2\alpha}$ sobre alguns aspectos imunorregulatórios das células-tronco mesenquimais.** 2020.103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) pertencem a um grupo de células clonogênicas e estudos mais recentes demonstraram a capacidade dessas células em modular/influenciar diversas funções de outras células. A imunorregulação pode ocorrer, através a interação direta célula-célula ou por meio da liberação de um amplo espectro de fatores bioativos, como citocinas e fatores de crescimento. Desta forma, as CTMs têm atraído cada vez mais atenção, devido sua capacidade terapêutica. As prostaglandinas (PGs) são metabólitos do ácido araquidônico, originados fisiologicamente através da ação da ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e COX-2 e exercem uma gama diversificada de atividades biológicas importantes para a resposta imune/inflamatória. Diversas prostaglandinas apresentam ações biológicas conhecidas, entretanto dados sobre o papel da prostaglandina F_2 alfa ($PGF_{2\alpha}$) são escassos. Alguns estudos, demonstram que a $PGF_{2\alpha}$ é capaz de aumentar a formação de colônias celulares e modular a produção de alguns outros mediadores como, por exemplo a produção de citocinas, porém nenhum estudo na literatura avalia a ação da $PGF_{2\alpha}$ sobre a capacidade imunorregulatória de CTMs. Sendo assim, esse estudo objetivou avaliar aspectos importantes da influência da $PGF_{2\alpha}$ sobre alguns mecanismos que atuam na ação imunorregulatória das CTMs. Os resultados demonstram que a $PGF_{2\alpha}$ na concentração de $2 \times 10^{-9} M$ tem a capacidade de aumentar a proliferação sem alterar a viabilidade celular. A $PGF_{2\alpha}$ também demonstrou capacidade de diminuir a fosforilação do fator de transcrição NF κ B, levando à atenuação da produção de IL-1 β e GM-CSF. Além disso, o meio condicionado de CTMs foi capaz de aumentar a produção de IL-10 em culturas de linfócitos. Dessa forma, conclui-se que a $PGF_{2\alpha}$ é capaz de modular algumas propriedades imunorregulatórias das CTMs.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; imunorregulação; prostaglandina F_2 alfa; citocinas; meio condicionado.

ABSTRACT

SANTOS, A.C.A. **Influence of prostaglandin F2 α on some immunoregulatory aspects of mesenchymal stem cells.** 2020.103p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Mesenchymal stem cells (MSC) belong to a group of clonogenic cells and recent studies have demonstrated the immunoregulatory capacity of these cells, been able to modulate/influence several functions of other cells. The immunoregulation can occur, through direct cell-cell interaction or through the release of a wide spectrum of bioactive factors, such as cytokines and growth factors. Thus, MSCs have attracted more attention, due to their therapeutic capacity. Prostaglandins (PGs) are metabolites of arachidonic acid, physiologically originated by the action of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 and play a diverse range of biological activities important for the immune/inflammatory response. Several prostaglandins have their biological actions known, however data on the role of prostaglandin F2 alpha (PGF_{2 α}) are scarce. Some studies show that PGF_{2 α} is able to increase the formation of cell colonies and modulate the production of some other mediators, such as the cytokines production. However, none study in the literature assesses the action of PGF_{2 α} on the MSCs immunoregulatory capacity. Therefore, this study aimed to evaluate important aspects of the PGF_{2 α} influence on some mechanisms that act in the MSCs' immunoregulatory role. Results demonstrate that PGF_{2 α} , at 2x10⁻⁹M concentration, has the ability to increase cell proliferation without altering cellular viability. PGF_{2 α} also demonstrated the ability to decrease the phosphorylation of the transcription factor NF κ B, reducing the IL-1 β and GM-CSF productions. In addition, the conditioned medium from MSCs was able to increase the lymphocytes production of IL-10. Thus, it is concluded that PGF_{2 α} is capable to modulate some immunoregulatory properties of MSCs.

Keywords: mesenchymal stem cells; immunoregulation; prostaglandin F2 alpha; cytokines; conditioned medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imunossupressão mediada por CTM	17
Figura 2	Atividade pró-inflamatória das CTMs	17
Figura 3	Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A2	21
Figura 4	Grupos para ensaios in vitro na etapa de padronização	25
Figura 5	Grupos para ensaios in vitro com C3H10T1/2.....	25
Figura 6	Grupos para ensaios in vitro com células imunes.....	26
Figura 7	Efeitos de diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células C3H10T1/2.....	37
Figura 8	Efeitos de diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no conteúdo proteico	38
Figura 9	Efeitos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas funções básicas das células C3H10T1/2.....	39
Figura 10	Efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na produção de fatores solúveis de células C3H10T1/2.....	41
Figura 11	Efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na expressão do gene envolvidos na resposta inflamatória em C3H10T1/2.....	42
Figura 12	Análise do conteúdo proteico dos fatores de transcrição NF κ B e STAT-3.....	43
Figura 13	Efeitos do meio condicionado C3H10T1/2 na linhagem de macrófagos e de linfócitos do baço.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos ensaios TaqMan® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.....	31
Tabela 2	Descrição dos anticorpos utilizados nas reações de <i>Western Blotting</i>	33
Tabela 3	Características dos ensaios TaqMan® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real resultados do anexo I	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKR Aldo-ceto redutases

AKR1B3 Aldo-ceto redutase família 1 membro B3

AMPc 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico

ATCC *American Type Culture Collection*

BSA Albumina sérica bovina

CAMs Molécula de adesão celular 1

CCL2 *C - C motif chemokine ligand 2*

CD Células dendríticas

cDNA DNA complementar

COX Ciclo-oxigenase

CTMs Células-tronco mesenquimais

CXCL9 *chemokine (CX-C motif) ligand*

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM *Dulbecco's modified Eagle*

ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FP Receptor de prostaglandina F2 alpha

GM-CSF Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

hASCs *Human adipose tissue-derived MSCs*

HGF *Hepatocyte growth factor*

HLA-G *Human leukocyte antigen G*

HO heme oxigenase

IDO indoleamina-2,3-dioxigenase

IFN- γ Interferon gama

IGF-1 Fator de crescimento tipo insulina 1

IL Interleucina

iNOS *Inducible nitric oxide synthase*

LPS Lipopolissacarídeo

MCP-1 Proteína monocítica quimiotática 1

M-CSF Fator estimulador de colônias de macrófagos

MIF *migration inhibitory factor*

MIP-1 α *macrophage inflammatory protein 1 alpha*

MO Medula óssea

MSCs *Mesenchymal stem cells*

NF- κ B Fator de transcrição κ B

NK *Natural killers*

NO Óxido Nítrico

PBS Solução salina fosfato

PD-1 proteína programada 1 da morte celular

PD-L ligante da morte celular programada

PE Ficoeritrina

PG Prostaglandinas

PGE₂ Prostaglandina E2

PGF_{2 α} Prostaglandina F2 alfa

PGFS Sintase de prostaglandina F2 alpha

PGI₂ Prostaciclina

PI3K Fosfoinosítideo 3-quinase

PPAR γ *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*

PTGFR Receptor de prostaglandina F2 alpha

RANTES *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RN18S RNA Ribossomal 18S

SMCs *Smooth muscle cells*

SP7 Sp7 Fator transcrição

SPP1 Fosfoproteína secretada 1

STAT-3 *Signaling transducer and activator of transcription 3*

TA Temperatura ambiente

TGF- β Fator de transformação do crescimento beta

TLR *toll-like receptor*

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

TSG-6 *TNF- α stimulated gene/protein 6*

TX tromboxanos

SUMÁRIO

Resumo	VIII
Abstract	IX
Lista de figuras	X
Lista de tabelas	XI
Lista de abreviaturas e siglas	XII
1.0 Introdução.....	16
1.1. Célula-tronco mesenquimais.....	16
1.2. Prostaglandinas	19
1.3. Ação da PGF_{2α} nas CTMs	23
2.0 Objetivo	24
3.0 Material e métodos	25
3.1. Grupos para ensaios <i>in vitro</i>.....	25
3.2. Cultivo da Célula-tronco Mesenquimal.....	26
3.3. Ensaio de MTT	27
3.4. Avaliação da viabilidade celular	27
3.5. Avaliação do ciclo celular	28
3.6. Ensaio de proliferação	28
3.7. Dosagens de citocinas pelas CTMs.....	29
3.8. Determinação da expressão dos genes de interesse	29
3.9. Determinação da expressão das proteínas NF-κB, p-NF-κB, STAT 3 e p- STAT 3 em CTMs.....	32
3.9.1. SDS-page e “western blotting”	32
3.9.2. Preparo do gel de poliacrilamida	32
3.9.3. Preparo de lisado de proteínas para SDS-page e “western blotting”	32
3.9.4. Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)	33
3.9.5. Sondagens das proteínas com anticorpos	33
3.9.6. Revelação com sistema quimioluminescente.....	34
3.10. Avaliação da proliferação dos mononucleares e da sua produção de citocinas quando cultivadas na presença de sobrenadante de CTMs	34
3.11. Análise Estatística	35

4.0 Resultados.....	36
4.1. Determinação da dose utilizada de PGF_{2α}.....	36
4.2. Efeito da PGF_{2α} na viabilidade celular C3H10T1/2, ciclo celular e taxa de proliferação.....	39
4.3. Efeito da PGF_{2α} na produção de fatores solúveis de células C3H10T1/2.....	40
4.4. Efeito da PGF_{2α} na expressão do gene C3H10T1/2	41
4.5. Efeito do PGF_{2α} no conteúdo proteico em C3H10T1/2.....	43
4.6. Os efeitos do meio condicionado C3H10T1/2 na linhagem de macrófagos e de linfócitos do baço	44
5.0 Discussão.....	46
6.0 Conclusão	53
Referências bibliográficas	54
Anexos	74

1.0 Introdução

1.1. Célula-tronco mesenquimais

A existência de células precursoras não-hemopoéticas na medula óssea (MO) foi descrita primeiramente por Friedenstein na década de 70 (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Desde então as CTMs adultas têm sido largamente estudadas em seus aspectos moleculares e funcionais (UCCELLI et al., 2008). Além da medula óssea, pode-se isolar as CTMs de outras fontes facilmente acessíveis, sendo que as mais comuns são: a membrana placentária (MIKI et al., 2005), tecido adiposo (ZUK et al., 2001) e polpa dentária (GRONTHOS et al., 2002).

As CTMs possuem capacidade de se diferenciar em células de origem mesodérmica, bem como modular as funções das mais diversas células presentes no microambiente tecidual (BIANCO et al., 2010). À vista disso, numerosos estudos têm considerado as CTMs como uma ferramenta promissora na terapia celular, uma vez que estas células são capazes de modular as funções de células do sistema imune, incluindo células T e B, células *natural killer* (NK), monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (DUFFY et al., 2011) e ainda produzem fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e angiopoietinas (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; SHI et al., 2010; BAIGUERA et al., 2012).

Sabe-se que os estímulos presentes no microambiente em que as CTMs se encontram estão diretamente relacionados com plasticidade imunológica destas células (WANG et al., 2012). Dependendo das condições em que estas células são expostas, as CTMs podem adotar um fenótipo imunossupressor ou pró-inflamatório. De forma geral, postula-se que altos níveis de citocinas pró-inflamatórias possuem capacidade de induzir um perfil imunossupressor nas CTMs, enquanto que na presença de baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias as CTMs adquirem um perfil pró-inflamatório (Gazdic et al., 2015).

Figura 1. Imunossupressão mediada por CTM. Dependendo dos estímulos presentes no microambiente as CTM adotam um fenótipo imunossupressor. As CTMs regulam a proliferação, a ativação e a função efetora de uma variedade de células imunes, através do contato célula a célula ou através da produção de fatores solúveis, incluindo IDO, PGE2, NO, TGF- β , HGF, HO-1, IL-6, IL -10, TSG-6 e sHLA-G (Adaptado de Gazdic et al., 2015).

Figura 2. Atividade pró-inflamatória das CTMs. Dependendo dos estímulos presentes no microambiente as CTMs podem adotar um fenótipo pró-inflamatório. O reconhecimento de moléculas microbianas por CTM residentes em tecidos resulta em aumento da produção de fatores de crescimento, como IL-8 e MIF, que recrutam neutrófilos e aumentam sua atividade pró-inflamatória. As CTM pró-inflamatórias secretam quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CXCL9 e CXCL10 que recrutam linfócitos para locais de inflamação e melhoram a resposta das células T (Adaptado de Gazdic et al., 2015).

Dessa forma, por exemplo, na presença de citocinas como, interferon gama (IFN- γ) ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) essas células adquirem caráter imunossupressor (DAZZI et al., 2012). A imunossupressão pode ocorrer através do contato célula-célula e da liberação de fatores solúveis pelas CTM, os quais são mediados por diferentes moléculas: prostaglandina E2 (PGE₂), indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), óxido nítrico, interleucina 27 (IL-27), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), proteína monocítica quimiotática 1 (MCP-1/CCL2), antígeno leucocitário humano do tipo G (s-HLAG), molécula de adesão celular 1 (CAMs) e outros (DUFFY et al., 2011; HADDAD, 2011).

A secreção de IL-6, M-CSF (fator de crescimento de colônias macrofágicas) e PGE₂ pelas CTMs inibem a diferenciação e maturação de células dendríticas (CD) diminuindo a expressão de moléculas co-estimulatórias e alterando o perfil de produção de citocinas nas CD (ZHANG et al., 2004; NAUTA et al., 2006; PREVOSTO et al., 2007; CHEN et al., 2008). As CTMs podem inibir a proliferação e a sobrevivência das células NK pela produção de IDO, antígeno s-HLAG5, TGF- β e PGE₂, e também através de suas propriedades citotóxicas exercidas pelo contato célula-célula (CTM-NK) (SPAGGIARI et al., 2006).

Além de regular a função de células da imunidade inata, as CTMs atuam sobre células da imunidade adaptativa. A ação anti-inflamatória e imunológica das CTMs se dá em grande parte por meio da inibição da ativação da célula T, que pode ser ou não acompanhada pelo aumento de células T regulatórias (Treg) (BARRY et al., 2005; GRIFFIN et al., 2010). A supressão dos linfócitos pode ocorrer mediante a modulação das células apresentadoras de antígenos, tais como as CDs, que levam à alteração na expressão de citocinas e aumento na apresentação de antígenos (ENGLISH et al., 2009). Segundo Najjar et al. (2010), CTMs isoladas de diferentes tecidos, igualmente suprimem a proliferação das populações de células T CD4⁺ e CD8⁺.

Dados revelam que as CTMs inibem a proliferação dos linfócitos B *in vitro* na maioria dos estudos (AUGELLO et al., 2005; CORCIONE et al., 2006; KRAMPERA

et al., 2006), em que há a produção de TGF- β pelas CTMs. Entretanto, outros trabalhos demonstram que as CTMs dão suporte à sobrevivência, proliferação e diferenciação das células B secretoras de antígenos em humanos (RASMUSSEN et al., 2007; TRAGGIAI et al., 2008). Sendo assim não há um consenso na literatura em relação a modulação de linfócitos B por parte das CTMs, o que ocorre provavelmente devido as diferentes condições experimentais de isolamento das células (UCCELLI et al., 2008).

A modulação das células B também é decorrente do contato célula-célula e de fatores solúveis, assim como ocorre com as células T. Neste caso a mediação é devido provavelmente pelo TGF- β produzido pelas CTM e interações entre o programa de morte celular 1 (pD1) e seus ligantes (Augello et al., 2005). As CTMs apresentam uma subpopulação produtora de IL-17 que atua de forma autócrina e ativa a via de sinalização do fator de transcrição kB (NFkB), inibindo a produção de TGF- β por essas células e comprometendo, dessa forma, sua característica imunossupressora (KRSTIC et al., 2012; YANG et al., 2013). Além disso, as CTM podem inibir a diferenciação e a expressão constitutiva dos receptores de quimiocinas (CORCIONE et al., 2006).

1.2. Prostaglandinas

Por terem sido primeiramente descobertas e isoladas de líquido seminal, como secreção da próstata, foram assim denominadas, sendo o sufixo “glandinas” associado à glândula. Atualmente, sabe-se que as prostaglandinas (PGs) estão presentes em todos os tecidos animais, exercendo várias funções (SWENSON e REECE, 1996; CUNNINGHAM e KLEIN, 2008).

As PGs são ácidos graxos constituídos por 20 átomos de carbono, derivados do ácido araquidônico (FONSECA et al., 1997) e atuam como sinais químicos celulares lipídicos, os quais são similares a hormônios, porém não chegam até a corrente sanguínea, atuando apenas na própria célula e/ou nas células vizinhas (resposta parácrina). São produzidas por quase todas as células, geralmente em locais de dano

tecidual ou infecção, pois estão envolvidas na resolução destas lesões (SWENSON e REECE, 1996; CUNNINGHAM e KLEIN, 2008).

Sabe-se que as PGs participam de diversas ações metabólicas, processos fisiológicos ou patológicos, como por exemplo, vasodilatação e vasoconstrição; hiperalgesia; contração e relaxamento da musculatura brônquica e uterina; hipotensão; ovulação; aumento do fluxo sanguíneo renal; proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida também no estômago; resposta imunológica; inibição da agregação plaquetária; regulação de atividade quimiotática; progressão metastática; função endócrina, entre outras (GONZÁLEZ e SILVA, 2003).

A síntese das PGs (assim como os leucotrienos) é desencadeada por estímulos nas membranas celulares, que podem ser de natureza fisiológica, farmacológica ou patológica. Tais estímulos ativam receptores de membrana, acoplados a uma proteína regulatória ligada a um nucleotídeo guanínico (proteína “G”), a partir desta ligação, ativa-se a fosfolipase A específica (WATANABE et al., 2008).

O local de atividade das COXs é um canal hidrofóbico que se encontra numa estrutura entre α hélices associadas à membrana. Desta maneira, o ácido araquidônico não precisa abandonar a membrana para servir como substrato. A síntese das PGs inicia-se com as COXs catalisando a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico, formando-se um produto intermediário, o PGG ou prostaglandina G_2 e posteriormente a PGH_2 . Estas PGs primárias, por assim dizer, têm pouca atividade, mas são substrato para formação das diversas PGs com atividade, como PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, prostaciclina (PGI_2) e também dos tromboxanos (TX) (figura 3) (SWENSON e REECE, 1996; CUNNINGHAM e KLEIN, 2008).

Figura 3. Biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A₂. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidos de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). No passo seguinte, a ciclooxigenase catalisa a formação de PGG₂, e em seguida a redução deste em PGH₂. O PGH₂ é subsequentemente convertido em uma série de prostaglandinas, incluindo PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e tromboxano A₂ (TXA₂), pela atividade de sintases específicas. Duas isoformas de ciclooxigenase (COX 1 e COX 2) estão caracterizadas em mamíferos, e a inibição não-seletiva destas formas é o principal mecanismo de ação das drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDs) (Adaptado de Gupta e DuBois, 2001).

As aldo-ceto redutases (*Aldo-keto reductases-AKR*) são redutases NAD(P)H-dependentes que catalisam a redução de uma variedade de grupos carbonila, incluindo os das PGs (JEZ et al., 1997). A sintase de PGF_{2α} (PGFS) pertence à família AKR1C (HAYAISHI et al., 1988; WATANABE et al., 1988). A PGFS é uma enzima que foi isolada inicialmente em mamíferos capaz de catalisar a redução de PGH₂ em PGF_{2α} e de PGD₂ em 9α11β-PGF₂, que é um estereoisômero de PGF_{2α}. Sabe-se também que AKR1B3 atua como PGFS em células pré-adipócitas (3T3-L1) de camundongos (FUJIMORI et al., 2010).

As PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ atuam aumentando o tônus uterino e a pressão intramiometrial, levando a contrações descoordenadas, assim como estimulam contrações da musculatura lisa do tubo digestivo e vasos sanguíneos, causando náuseas, vômitos, diarreia, irritabilidade e cefaleia (FONSECA et al., 2001). Ademais, a $PGF_{2\alpha}$ tem sido identificada como luteolítico natural em várias espécies de mamíferos (WAITE et al., 2005) e a sua ligação aos seus receptores na membrana das células luteais esteroideogênicas estimula a atividade da proteína quinase C (BERTAN et al., 2006). A $PGF_{2\alpha}$ também pode induzir aumento da temperatura corporal. Seu efeito nos rins causa vasodilatação, o que resulta num aumento do fluxo sanguíneo renal e o aumento da excreção de água e de eletrólitos na urina (MICHAUD et al., 2014).

A $PGF_{2\alpha}$ ainda é conhecida por desempenhar um importante papel no tecido muscular esquelético, o que inclui o suporte de receptores hormonais, proliferação, aumento da síntese proteica e intensificação da sinalização do IGF-1 (Fator de crescimento tipo insulina 1), um hormônio tipo insulina com marcantes efeitos anabólicos, via fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K) (William Llewellyn's ANABOLICS, 10th ed., 2011). Assim como outros metabolitos do ácido araquidônico, a $PGF_{2\alpha}$ é capaz de induzir a leucocitose, o que pode ser resultado de efeitos supressores em polimorfonucleados circulantes (JAGELS E HUGLI, 1994). Análogos estáveis de prostaglandinas, M- PGE_1 , DM- PGE_2 e M- $PGF_{2\alpha}$ demonstraram capacidade de induzir marcante neutrofilia, tanto relativa quanto absoluta, enquanto a M- PGE_1 e M- $PGF_{2\alpha}$ administrada de forma subcutânea causou diminuição significativa no número absoluto de células T circulantes (ULICH et al., 1986).

A via de sinalização da $PGF_{2\alpha}$ ocorre através de um receptor acoplado a proteína G, denominado de FP (FUJIMORI et al., 2010). A ativação dos receptores prostaglandina F (FP) resulta em um aumento do íon de cálcio citosólico e as concentrações de AMP cíclico, e leva a contração das fibras musculares em células musculares lisas. Recentemente, mostrou-se que a aplicação tópica de agonistas de FP na pele dorsal do rato estimula o crescimento de pelo (KANEKO et al., 2008).

Além de ligar-se ao seu receptor de membrana (FP), estudos mostraram que $\text{PGF}_{2\alpha}$ é capaz de ativar receptores prostaglandina E (EP1 e EP3) em testes *in vitro*, embora essa associação ocorra com uma afinidade menor do que entre PGE_2 e estes receptores (SUGIMOTO et al. 1992; WATABE et al. 1993).

1.3. Ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas CTMs

Os estudos na literatura são escassos em relação a ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre as funções de CTMs. Os poucos estudos que correlacionam a ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na ação de CTMs não avaliam a função imunorregulatória dessas células.

Um estudo, realizado com CTM da linhagem ST2 de camundongos observou que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ está envolvida na supressão da progressão da fase precoce da adipogênese, atuando através do receptor FP após a determinação do destino celular que faz com que as CTMs se diferenciarem em adipócitos, juntamente com a expressão aumentada de COX-2 (FUJIMORI et al., 2010). Em um outro, estudo também é demonstrada que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é um potente inibidor fisiológico da diferenciação dos adipócitos, sendo capaz de inibir a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 (CASIMIR et al., 1996).

Adicionalmente, outro estudo demonstrou pela primeira vez que o meio condicionado com IL-1 β derivado de macrófagos ativados estimulam a diferenciação de CTM derivadas de tecido adiposo humano (human adipose tissue-derived MSCs –hASCs) em células musculares lisas (*Smooth muscle cells* - SMCs) através de um mecanismo dependente $\text{PGF}_{2\alpha}$. (LEE et al., 2012)

Têm-se evidências de que a inibição da diferenciação pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ ocorre por meio de uma via de sinalização que requer as subunidades $\text{G}\alpha_q$ da proteína G heterotrimérica, a elevação da concentração de cálcio intracelular e a ativação do Ca^{2+} / serina regulada por calmodulina / calcineurina treonina fosfatase. Os dados indicam que $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula uma via dependente de $\text{aG}\alpha_q\text{-Ca}^{2+}\text{-calcineurina}$, via de sinalização que atua bloqueando a expressão de $\text{PPAR}\gamma$ e C / $\text{EBP}\alpha$ (LIU; CLIPSTONE, 2007).

2.0 Objetivo

As células-tronco mesenquimais são células que apresentam capacidade imunorregulatória, o que as tornam promissoras candidatas a serem empregadas clinicamente como uma importante ferramenta imunoterápica. Sabendo-se que as prostaglandinas atuam em diversos processos dessa imunorregulação, esse trabalho objetivou estudar os efeitos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre alguns aspectos imunorregulatórios das células-tronco mesenquimais.

3.0 Material e métodos

3.1. Grupos para ensaios *in vitro*

Inicialmente para a etapa de padronização foram utilizados 4 grupos experimentais (**Figura 4**) e após a escolha da concentração da 2×10^{-9} M de $\text{PGF}_{2\alpha}$ deu-se sequência com apenas 3 grupos experimentais (**Figura 5**), conforme descritos abaixo:

Figura 4. Grupos para ensaios *in vitro* na etapa de padronização.

Figura 5. Grupos para ensaios *in vitro* com C3H10T1/2.

Na etapa final do trabalho, onde se avaliou a capacidade imunorregulatória das CTMs sobre células imunes, sendo elas, macrófagos e linfócitos foram utilizados 3 grupos experimentais (**Figura 6**), conforme descritos abaixo:

Figura 6. Grupos para ensaios *in vitro* com células imunes.

3.2. Cultivo da Célula-tronco Mesenquimal

Foram utilizadas culturas de célula-tronco mesenquimal da linhagem C3H10T1/2 (American Type Culture Collection - CCL226; Rockville, MD). 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 (Vitrocell) e tampão Hepes (2g/L) com pH final entre 7,2 a 7,4.

As culturas foram adicionadas a incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ á 37°C, para proliferação celular e aderência a garrafa. Inicialmente o meio de cultura foi trocado após 3 ou 4 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%.

Inicialmente, foi realizado testes preliminares para definição das doses de PGF_{2α} [17-fenil trinor prostaglandina F2α, - Cayman Chemicals, Michigan, EUA] de acordo com as doses mais usuais encontradas na literatura. Dessa forma, foram testadas as doses de 2x10⁻¹³M, 2x10⁻⁹M e 2x10⁻⁷M (Lindsey et al., 1994; Serrero and Lepak, 1997).

Depois da padronização da dosagem de $\text{PGF}_{2\alpha}$, as células C3H10T1/2 foram cultivadas como descrito acima com $\text{PGF}_{2\alpha}$ na concentração de $2 \times 10^{-9} \text{M}$ por 24 horas. Após o estímulo $\text{PGF}_{2\alpha}$, as células foram estimuladas com LPS com LPS [lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*; sorotipo 026: B6 - Sigma Chemical Co., EUA) a uma concentração de $1,25 \mu\text{g} / \text{mL}$ por duas horas, conforme padronizado anteriormente em nosso laboratório; essa concentração teve o potencial de amplificar a resposta inflamatória e ativar a resposta imune inata sem resultar em alta porcentagem de morte celular (Chen et al., 2015; Dos Santos et al., 2017; Fock et al., 2007).

3.3. Ensaio de MTT

O ensaio colorimétrico MTT, 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 CTMs à $\text{PGF}_{2\alpha}$, adicionou-se ao sobrenadante da placa, a solução de MTT (5mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) na proporção 9:1 por poço da placa. Em seguida as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C . Posteriormente, a solução (sobrenadante + MTT) foi aspirada e $100 \mu\text{L}$ de DMSO foram adicionados por poço para a dissolução dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em 540nm no espectrofotômetro EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA).

3.4. Avaliação da viabilidade celular

As células foram mantidas em cultura como descrito no item 3.2 na concentração de 2×10^5 células/ml em placas de 24 wells para a avaliação da viabilidade. Após o período de cultura as células foram retiradas com tripsina (Vitrocell embriolife®) e centrifugadas 1200rpm por 10min . Ao pellet foi adicionado $50 \mu\text{L}$ de tampão anexina, $2,5 \mu\text{L}$ de anexina V e $8 \mu\text{L}$ de iodeto de propídio, nos tubos

controles foram adicionados apenas o anticorpo correspondente. Na sequência as amostras foram incubadas por 20 min no escuro em temperatura ambiente. Ao final foram acrescentados mais 200µl de tampão anexina e então realizada a análise no citômetro de fluxo FACS Canto (Becton and Dickinson, San Jose, CA, USA). Um total de 20.000 eventos foi adquirido e para as análises posteriores à aquisição foi utilizado do programa CELLQuest Pro®.

3.5. Avaliação do ciclo celular

Para a avaliação do ciclo celular das CTM após tratamento com a presença ou ausência de PGF_{2α}, foram preparadas placas de 12 wells com 1x10⁶ células/well. As placas foram mantidas em incubadora com atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ á 37°C durante 24 horas

Após, as células foram retiradas da placa com uso de tripsina e então ressuspensas em 50µl de PBS. Em seguida foram adicionados 200µl de etanol 70% e os tubos foram mantidos no gelo por 20 minutos, os tubos então foram centrifugados e o sobrenadante retirado, permanecendo apenas o pellet no tubo.

Ao pellet foi adicionado 2,5µl de RNase e os tubos foram mantidos em 37° C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados aos tubos 4µl de iodeto de propídeo e estes foram mantidos em 37° C por mais 30 minutos. Após os tubos foram analisados do citômetro. A análise se dará pela quantificação da porcentagem das regiões G0/G1 e S/G2/M, utilizando os programas CELLQuest® (versão 3.4, Becton Dickinson) e ModFit 3.0.

3.6. Ensaio de proliferação

A determinação da incorporação do análogo da timidina 5-bromo -20-desoxiuridina (BrdU) no DNA é o método de detecção de proliferação mais preciso e foi usada para medir a taxa de proliferação de células. Após a incorporação de EdU (um análogo da timidina modificado) no DNA recém-sintetizado, a peroxidase é covalentemente ligada por meio de uma reação altamente específica. O reagente

Amplex UltraRed, um substrato da peroxidase, é então adicionado e o sinal de fluorescência resultante é detectado. Devido à ligação altamente específica da peroxidase a EdU, este ensaio resulta em uma medição altamente sensível e confiável da proliferação de células.

Para a realização deste ensaio foi utilizado o kit comercial: ClickiT™ EdU Microplates Assay (Cat. C10214 - Molecular Probes, Eugene, OR, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.7. Dosagens de citocinas pelas CTMs

As células C3H10T1/2 foram mantidas em cultura conforme descrito no item 3.2. As CTMs ficaram em cultura a 37 °C, 5% de CO₂, em placas de cultura com 24 poços na concentração de 1x10⁵ células/ml. As células foram cultivadas na presença PGF_{2α}, e estimuladas ou não com LPS. Após 24 horas, o sobrenadante da cultura celular foi removido e congelado (-40°C) para posterior dosagem da concentração de IL1β, IL6, IL10, GM-CSF, TGFβ e PGE₂ presente no sobrenadante das culturas celulares foi realizada pelo método de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) – utilizando-se de kits comerciais (Cayman Chemical, Michigan, USA para PGE₂ e para as demais análises Quantikine ELISA® R&D Systems).

3.8. Determinação da expressão dos genes de interesse

A determinação da expressão dos genes PPARγ, NF-κB, STAT3, TGF-β e IL-6 (**Tabela 1**) foi feita por PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*® (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e os ensaios foram conduzidos no equipamento *A&B StepOne Plus Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Neste sistema, a amplificação é avaliada por monitoramento contínuo da fluorescência de cada amostra, entre 520 e 660 nm, de forma que a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA presente na amostra. Estes dados são traduzidos por um software específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos

para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa (HIRAYAMA et al., 2008).

O volume total de reação de 10 µl foi composto de 1,0 µL de cDNA, 5,0 µl de *TaqMan® Fast Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 0,5 µl de cada iniciador (sense e antisense) – marcado com sonda FAM e referência passiva ROX – e 3,5 µl de água livre de DNase e RNase. As condições de ciclagem foram: pré-incubação por 2,0 minutos a 50°C e por 20 segundos a 95°C para desnaturação das dupla-fitas de cDNA, seguido de 40 ciclos de 01 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C.

Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ct, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula: Taxa de expressão relativa = $2^{-(\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador})} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$

O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. Como calibrador, foi utilizada a média aritmética do ΔCt das CTM do grupo Controle, empregada como base para resultados comparativos. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos.

Tabela 1: Características dos ensaios TaqMan® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.

Nome do gene	Símbolo do gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Receptor Ativado por Proliferador de Peroxisome Gamma	PPAR γ	<i>Mus musculus</i>	Mm01184322_m1	101
Transdutores de sinal e ativadores da transcrição 1	STAT3	<i>Mus musculus</i>	Mm01219775_m1	75
Fator de transcrição nuclear Kappa B	NF- κ B	<i>Mus musculus</i>	Mm00479807_m1	64
Fator de transformação do crescimento	TGF- β	<i>Mus musculus</i>	Mm00436955_m1	82
Interleucina 6	IL-6	<i>Mus musculus</i>	Mm00446190_m1	78
18S RNA Ribossomal	RN18S	<i>Mus musculus</i>	Mm03928990_g1	61

pb: pares de bases

3.9. Determinação da expressão das proteínas NF- κ B, p-NF- κ B, STAT 3 e p- STAT 3 em CTMs.

A expressão da proteína NF- κ B, p-NF- κ B, STAT 3, p- STAT 3 em C3H10T1/2, mantidos sob cultura como descrito no item 3.2, foram determinados pela técnica de Western Blotting.

3.9.1. SDS-page e “western blotting”

3.9.2. Preparo do gel de poliacrilamida

Foi procedido conforme protocolo de SAMBROOK ET AL. (1989) E HARLOW & 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. O gel inferior (resolutivo) foi preparado com 6 a 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

3.9.3. Preparo de lisado de proteínas para SDS-page e “western blotting”

Os lisados foram preparados a partir de 1×10^6 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 μ g/mL aprotinina, 1 μ g/mL leupeptina, 100 μ g/mL PMSF, 0,5 mM EDTA). O material foi sonificado (30 segundos), centrifugado por 10 minutos, a 20.000 rpm, e 4°C. o sobrenadante foi quantificado e um volume correspondente a 200 μ g 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 minutos a 100°C, para desnaturação das proteínas e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida. Como padrão foi utilizada a mistura pré-corada Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (THERMO SCIENTIFIC, EUA) (5-10 μ g de proteína).

3.9.4. Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

O gel contendo as proteínas fracionadas por eletroforese foi incubado 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. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel 3MM, membrana, gel, 2 folhas de 3 MM (Whatman), esponja. Procederá à transferência em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 200-400 mA, por 30-90 min.

A eficiência da transferência foi verificada, corando-se a membrana por 5-10 min com corante Ponceau (1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com água destilada ou TBS (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCl 0,9 %).

3.9.5. Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico, a 3 %, em tampão TBS, por 2 h, sob agitação. O anticorpo específico foi diluído (cMyc, p-cMyc, NF- κ B, p-NF- κ B, STAT 3, p- STAT 3 e PPAR γ – **Tabela 2**) em TBS com 0,05% Tween 20 (TBST) e utilizado para a incubação com as membranas, por 14-16h. A membrana foi então lavada 3 vezes, por 10 min, com TBST. As proteínas foram sondadas com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:10.000 em TBST, por 2 horas, sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes, por 10 min, com agitação.

Tabela 2: Descrição dos anticorpos utilizados nas reações de *Western Blotting*

Anticorpo	Fabricante	Referência
anti-NF- κ B	Santa Cruz	SC-372
anti-p-NF- κ B	Santa Cruz	SC-33039
anti-STAT 3	Santa Cruz	SC-482
anti-p- STAT 3	Santa Cruz	SC-8001-R

3.9.6. Revelação com sistema quimioluminescente

A revelação foi realizada utilizando-se o Kit ECL Plus (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio), para análise foi utilizada o digitalizador de Imagem ImageQuant 400 (GE Helthcare).

3.10. Avaliação da proliferação dos mononucleares e da sua produção de citocinas quando cultivadas na presença de sobrenadante de CTMs

Nessa etapa, foram utilizados macrófagos da linhagem Raw 264,7(Banco de Células do Rio de Janeiro - APABCAM). Essas células foram cultivadas em meio de cultura DEMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e tampão Hepes (2g/L) com pH final entre 7,2 a 7,4. Essas células foram cultivadas em atmosfera umidificada (95%), a 37°C e 5% de CO₂ e o seu meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Quando próximas a confluência, as células foram retiradas com o auxílio de um *cell scraper* e plaqueadas em placa de 24 poços, na concentração de 1x10⁶ células/mL de meio DMEM ou sobrenadantes provenientes da cultura prévia de CTMs.

Para os ensaios com cultura de sobrenadante das CTM em linfócitos, células utilizamos o baço de camundongos C57Bl/6 adultos. O estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA / FCF 554). Os baços foram removidos e dissociados suavemente em placas de Petri contendo 4 mL de meio DMEM (Vitrocell). A cápsula do baço foi descartada e o conteúdo intracapsular foi ressuspenso. As células mononucleares foram separadas pelo método do gradiente de densidade com Ficoll Histopaque® (Sigma). Finalmente, as células mononucleares foram plaqueadas na concentração de 1x10⁶ células/mL. Sendo igualmente cultivadas em meio DMEM ou sobrenadantes provenientes da cultura prévia de CTMs.

Após esse período, os sobrenadantes de ambos tipos celulares foram coletados e acondicionados a temperatura de -40°C para a determinação da produção de IL-1β, IL-10 e TNFα para os macrófagos em cultura e IL-4, IL-10 e INF-γ para os linfócitos por ELISA.

3.11. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 5. Os dados foram submetidos primeiro a um teste de normalidade por adesão à curva normal (curva gaussiana) e foi aplicada a análise estatística de Teste T ou Teste de Mann Whitney. Para análise dos dados de múltiplas comparações entre os grupos, foi realizada a análise de variância e o teste post hoc de Bonferroni. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® (San Diego, CA, EUA), e os dados são expressos como valores médios com seus desvios de erro padrão. O ponto de corte adotado para diferenças estatisticamente significantes foi de 5% ($p < 0,05$).

4.0 Resultados

4.1. Determinação da dose utilizada de $\text{PGF}_{2\alpha}$

Para determinar a dosagem apropriada de $\text{PGF}_{2\alpha}$, investigamos a viabilidade celular, a atividade mitocondrial, a produção de citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10) e a expressão de NF κ B e STAT-3 nas células C3H10T1/2.

Entre as três dosagens analisadas, apenas a concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 2×10^{-7} M diminuiu a viabilidade celular das células C3H10T1/2 em cultura. Nossos dados mostram um aumento no ensaio MTT com concentrações de 2×10^{-13} M e 2×10^{-9} M, o que indica um aumento na atividade da desidrogenase láctica presente nas mitocôndrias (**Fig. 7**). No entanto, não foram observadas alterações significativas na produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10 (**Fig. 7**). Nesse contexto, a concentração de 2×10^{-9} M $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi selecionada porque é a concentração mais alta testada que não afeta a viabilidade celular. Adicionalmente, avaliamos a expressão das proteínas NF κ B, p-NF κ B, STAT-3 e p-STAT-3 em células C3H10T1 / 2 cultivadas com 2×10^{-9} M de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e não foram observadas diferenças no conteúdo proteico quando comparadas às células cultivadas sem $\text{PGF}_{2\alpha}$ (**Fig. 8**).

Figura 7. Efeitos de diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células C3H10T1/2 (A) Viabilidade, (B) Ensaio MTT, (C) Produção de IL-10, (D) Produção de IL-1β e (E) Produção de IL-6. Os resultados são expressos como a média ± SEM (n ≥ 6). Diferenças significativas entre os grupos são ilustradas por: *p ≤ 0.05 and **p ≤ 0.01.

Figura 8. Efeitos de diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no conteúdo proteico de (A) p-STAT-3, (B) STAT-3, (C) p-NF κ B e (D) NF κ B. Resultados de quatro experimentos independentes da análise de Western Blots. Após análise densitométrica, os resultados foram normalizados para os valores de β -actina. Os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM (n $\geq$ 4).

4.2. Efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na viabilidade celular C3H10T1/2, ciclo celular e taxa de proliferação

A fim de investigar os efeitos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas funções básicas das células C3H10T1/2, a cultura e os tratamentos foram realizados conforme descrito para analisar melhor a viabilidade celular, o ciclo celular e a taxa de proliferação (**Fig. 9 A-C**).

A viabilidade celular C3H10T1/2 não foi alterada pelo estímulo LPS ou $\text{PGF}_{2\alpha}$, ou pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ em associação com o estímulo LPS (**Fig. 9A**). Além disso, os dados mostram que o $\text{PGF}_{2\alpha}$ em associação com o estímulo LPS foi capaz de aumentar a porcentagem de células C3H10T1/2 na fase S/G2/M (**Fig. 9 B**), bem como a taxa de proliferação celular (**Fig. 9 C**).

Figura 9. Efeitos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas funções básicas das células C3H10T1/2. (A) Viabilidade, (B) Fases do ciclo celular e (C) Índice de proliferação de células C3H10T1/2 cultivadas com $2 \times 10^{-9} \text{M}$ de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e estimuladas com LPS. Os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM ($n = 4$). Diferenças significativas entre os grupos de tratamento com LPS são ilustradas por: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

4.3. Efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na produção de fatores solúveis de células C3H10T1/2

A produção de citocinas é um fator chave para a capacidade imunorreguladora das CTM. Para avaliar os efeitos do $\text{PGF}_{2\alpha}$ na produção de citocinas nas células C3H10T1/2, medimos as principais citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas por essas células (**Fig. 10 A-F**). Observamos que a estimulação com $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi capaz de reduzir a produção de $\text{IL-1}\beta$ (**Fig. 10A**), bem como GM-CSF (**Fig. 10C**) em células estimuladas com LPS. No entanto, a estimulação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não alterou a produção de IL-6 (**Fig. 10 B**), IL-10 (**Fig. 10 D**), $\text{TGF-}\beta$ (**Fig. 10 E**) e PGE_2 (**Fig. 10 F**) em células C3H10T1/2 estimuladas com LPS.

Figura 10. Efeito da PGF_{2α} na produção de fatores solúveis de células C3H10T1/2. (A) produção de IL-1, (B) produção de IL-6, (C) produção de GM-CSF, (D) Produção de IL -10, (E) produção de TGF-β e (F) produção de PGE₂ pelas células C3H10T1/2 cultivadas com 2x10⁻⁹M de PGF_{2α} e estimuladas com LPS. Os resultados são expressos como a média ± SEM (n = 4). Diferenças significativas entre os grupos de tratamento com LPS são ilustradas por: * p<0,05 e ** p<0,01.

4.4. Efeito da PGF_{2α} na expressão do gene C3H10T1/2

A expressão gênica de NFκB, PPARγ e STAT-3 foi avaliada, uma vez que esses fatores de transcrição são moduladores essenciais da inflamação. Além disso, foi investigada a expressão gênica de TGF-β e IL-6, por se tratar de citocinas de grande importância nos processos de imunorregulação mediados pelas CTMs (**Fig. 11 A-E**).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi capaz de reduzir a expressão do gene $\text{NF}\kappa\text{B}$ em C3H10T1/2 após estimulação com LPS (**Fig. 11 A**). Não foram detectadas alterações na expressão do gene $\text{PPAR}\gamma$ (**Fig. 11 B**) ou STAT-3 (**Fig. 11 C**), embora tenha sido observado um aumento leve, mas não estatisticamente significativo, na expressão do gene $\text{PPAR}\gamma$ em células C3H10T1/2 cultivadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ e estimuladas com LPS em comparação com as células C3H10T1/2, apenas estimuladas com LPS. A expressão gênica de $\text{TGF-}\beta$ (**Fig. 11 D**) e IL-6 (**Fig. 11 E**) não foi alterada entre os grupos.

Figura 11. Efeito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na expressão do gene envolvidos na resposta inflamatória em C3H10T1/2. Expressão de mRNA de (A) $\text{NF}\kappa\text{B}$, (B) $\text{PPAR}\gamma$, (C) STAT-3 , (D) $\text{TGF-}\beta$ e (E) IL-6 de células C3H10T1/2 cultivadas com $2 \times 10^{-9}\text{M}$ de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e estimulada com LPS. Os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM ($n=6$). Diferenças significativas entre os grupos de tratamento com LPS são ilustradas por: $*p \leq 0.05$.

4.5. Efeito do $\text{PGF}_{2\alpha}$ no conteúdo proteico em C3H10T1/2

Para verificar os resultados da expressão gênica, também foi realizada a análise do conteúdo proteico dos fatores de transcrição NF κ B e STAT-3. Essas vias de sinalização são ativadas rapidamente em resposta a vários estímulos, incluindo estresse e citocinas.

Dados da análise de western blotting para as proteínas NF κ B, p-NF κ B, STAT-3 e p-STAT-3 mostraram que o $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi capaz de diminuir a razão p-NF κ B/NF κ B nas células C3H10T1/2 estimuladas com LPS quando comparadas às células apenas estimulado com LPS (**Fig. 12 A**). No entanto, não foram observadas alterações significativas na razão p-STAT-3/STAT-3 (**Fig. 12 B**).

Figura 12. Análise do conteúdo proteico dos fatores de transcrição NF κ B e STAT-3. Análise de western blotting da proporção das proteínas (A) p-NF κ B/NF κ B e (B) pSTAT-3 / STAT-3 de células C3H10T1/2 cultivadas com 2×10^{-9} M de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e estimuladas com LPS. Os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM (n= 4). Após análise densitométrica, os resultados foram normalizados para os valores de β -actina. Diferenças significativas entre os grupos de tratamento com LPS são ilustradas por: * $p \leq 0,05$.

4.6. Os efeitos do meio condicionado C3H10T1/2 na linhagem de macrófagos e de linfócitos do baço

A fim de se investigar se a $\text{PGF}_{2\alpha}$ afetaria a capacidade imunorregulatória das células C3H10T1/2, alterando a produção de citocinas pelas células imunes cultivadas *in vitro*. Macrófagos e linfócitos foram cultivados em meio condicionado de células C3H10T1/2. As citocinas avaliadas foram $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 e IL-1 β para culturas de macrófagos (**Fig. 13 A**) e IL-4, IL-10 e INF- γ para culturas de linfócitos (**Fig. 13 B**).

Como mostrado na Figura 12 A, os meios condicionados de ambos os grupos tinham capacidade para reduzir a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 β pelos macrófagos, enquanto a produção de IL-10 aumentou, em relação ao grupo cultivado apenas com meio DMEM e estímulo de LPS. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos proporcionadas pela $\text{PGF}_{2\alpha}$. Além disso, o meio condicionado das células C3H10T1/2 mostrou efeitos supressores na proliferação de macrófagos avaliados pelo ensaio MTT, no entanto, não foi observada diferença entre o meio condicionado das células C3H10T1/2 estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o meio condicionado das células C3H10T1/2 não estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ (dados não mostrados).

Ao analisar a capacidade dos meios condicionados das células C3H10T1/2 em afetar a produção de citocinas pelos linfócitos, observamos que os meios condicionados às células C3H10T1/2 foram capazes de aumentar a produção de IL-4 e IL-10 (**Fig. 13 B**). Embora a produção de IL-4 pelos linfócitos permaneça semelhante entre os grupos, a produção de IL-10 foi significativamente maior quando os linfócitos foram cultivados em meio condicionado a partir de células C3H10T1/2 estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ e comparadas com o meio condicionado a partir de células C3H10T1/2 não estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$. O meio condicionado das células C3H10T1/2 estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ diminuiu a produção de IFN- γ pelos linfócitos, embora esse efeito não tenha sido estatisticamente significativo; meios condicionados das células C3H10T1/2 não estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ mostraram resultados opostos. Além disso, a taxa de proliferação de linfócitos, avaliada pelo ensaio MTT, não mostrou diferenças entre os meios condicionados das células C3H10T1/2 estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ e os

meios condicionados das células C3H10T1/2 não estimuladas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ (dados não mostrados).

Figura 13. Efeitos do meio condicionado C3H10T1/2 na linhagem de macrófagos e de linfócitos do baço. (A) Avaliação da produção de TNF- α , IL-10 e IL-1 β por macrófagos murinos RAW264.7 e (B) Avaliação da produção de IL-4, IL-10 e INF- γ por linfócitos do baço cultivados *in vitro* com meios condicionados das células C3H10T1/2 cultivadas com $2 \times 10^{-9} \text{M}$ de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e estimuladas com LPS. Os resultados são apresentados como *fold of change* em comparação com seus respectivos controles (células RAW264.7 cultivadas em meio DMEM e estimuladas com LPS, bem como linfócitos do baço cultivadas em meio DMEM e estimulados com LPS). Os resultados são expressos como a média $\pm$ SEM ($n = 6$). Diferenças significativas entre os grupos de tratamento são ilustradas por: * $p \leq 0,05$.

5.0 Discussão

Somente na década de 70 foram encontrados dados concretos da existência de células-tronco não-hematopoiéticas na MO (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Hoje, sabe-se que a CTM é um importante componente do microambiente hematopoético (KASSEM e ABDALLAH, 2008; HOCKING e GIBRAN, 2010). Uma vez que, além de se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (BARRY e MURPHY, 2004; JUNG et al., 2009; WATABE e MIYAZONO, 2009; KURODA et al., 2010), as CTMs são capazes de influenciar a função de outras células através de interação direta célula-célula ou por meio da liberação de um amplo espectro de fatores bioativos, como citocinas e fatores de crescimento (OLIVEIRA, 2010), tais como: IL-1 α , IFN β IL-6, IL-8, GM-CSF, MIF (fator inibidor de macrófagos) CCL2, CCL3, CCL12, IDO, PGE₂, TGF β 1, HLA-G5, activin A, CXCL13, HGF, TSG-6, M-CSF, Jagged 2 (Le Blanc and Davies, 2015), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), heme oxigenase-1 (HO1) (Uccelli et al., 2008).

Diversos estudos foram realizados e revelaram a capacidade das CTMs de modular células imunes em resposta a circunstâncias e condições microambientais. A capacidade imunossupressora das CTMs foi demonstrada em estudos *in vitro* e *in vivo*, esses efeitos são observados tanto em células inatas (macrófagos, células NK, células dendríticas) quanto em células imunes adaptativas (células T, células B) (Gomzikova et al., 2019). Sem dúvida, as CTMs são uma ferramenta promissora para terapia celular. As propriedades imunorreguladoras das CTMs vão além da expressão de moléculas de superfície específicas e incluem a secreção de muitos fatores solúveis, especialmente citocinas (Kot et al., 2019).

Alguns estudos sugerem que as CTMs apresentam características imunossupressoras, uma vez que essas células podem inibir a diferenciação e proliferação de células imunológicas, inibir a ativação do sistema complemento pela síntese de fator H, além de exercerem ação inibitória em diferentes tipos celulares como linfócitos B e T, células NK e dendríticas (NAUTA et al., 2006).

Apesar disso, as CTMs não são constitutivamente imunossupressoras, podendo assumir até mesmo um fenótipo pró-inflamatório, dependendo de quais citocinas e da quantidade de exposição a este microambiente (Gazdic et al., 2015).

As PGs exercem uma gama diversificada de atividades biológicas através da interação com seus receptores que estão presentes em praticamente todos os tecidos (COLEMAN et al., 1990, 1994). Diversos estudos já demonstraram que a PGE_2 é de extrema relevância nas propriedades imunorreguladoras da CTM. Interessante ressaltar que as CTMs produzem PGE_2 sem necessitar de sinais de indução (Kota et al., 2017; Li et al., 2016; Rozenberg et al., 2016; Wen et al., 2018). Enquanto, que o papel da $PGF_{2\alpha}$ nas CTMs permanece desconhecido. Em relação a ação da $PGF_{2\alpha}$ a literatura é um tanto quanto escassa, sendo que a maioria dos estudos se concentram na sua ação presente no sistema reprodutivo de fêmeas (Skarzynski and Okuda, 2010).

Entretanto, a literatura também relata que a $PGF_{2\alpha}$ participa de muitas funções biológicas diferentes (Agas et al., 2013; Wang et al., 2018; Yu et al., 2009). Dentre as quais podemos relatar também a capacidade de aumentar a formação de colônias celulares (MILLER et al., 1978) e induzir a leucocitose, o que pode ser resultado de efeitos supressores em polimorfonucleados circulantes (JAGELS e HUGLI, 1994). Em relação a sua ação sobre as CTMs tem-se mostrado que a $PGF_{2\alpha}$ é um potente inibidor fisiológico da diferenciação dos adipócitos (CASIMIR et al., 1996), além de ser capaz de estimular a diferenciação de CTMs derivadas de tecido adiposo em células musculares lisas (LEE et al. 2012).

Neste trabalho nos propomos em avaliar aspectos importantes da influência da $PGF_{2\alpha}$ sobre alguns mecanismos que controlam as principais funções das CTMs, uma vez que as CTMs possuem capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares e atuar formando microambientes com capacidade imunorregulatória, ou mesmo de modular direta ou indiretamente outras células, alterando sua sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento.

Inicialmente foi realizado uma padronização para a escolha da concentração da $PGF_{2\alpha}$. O ensaio de MTT revelou uma maior atividade da desidrogenase mitocondrial nas células cultivadas na presença de $PGF_{2\alpha}$ nas concentrações de -13M e -9M, o que poderia indicar um aumento da proliferação das CTMs em cultura.

Em relação à viabilidade celular demonstramos que a $PGF_{2\alpha}$ não interfere na viabilidade celular dos grupos -13M e -9M. Contudo, a concentração de -7M diminui a

viabilidade celular aumentando o percentual de células em apoptose, apesar da viabilidade ainda permanecer acima de 80% neste grupo.

Na etapa de padronização também foram avaliadas algumas citocinas para verificar se haveria produção das mesmas de forma dose dependente de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os resultados mostraram que a $\text{PGF}_{2\alpha}$, independentemente da concentração, não altera de forma relevante os níveis de $\text{IL1}\beta$, IL6 , IL10 e $\text{TGF}\beta$ em cultura de CTMs.

Diante do exposto acima, escolheu-se a concentração de 10^{-9}M para dar continuidade dos experimentos, por se tratar da maior concentração testada que não alterou da viabilidade celular.

Visto que buscamos investigar a influência da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas CTMs, primeiramente foram analisados os dados referentes ao cultivo das CTMs apenas na presença e ausência da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Nesta avaliação não foi possível detectar variações significativas nas quantificações de NO, bem como, na expressão dos genes PTGFR , AKR1B3 , SP7 e SPP1 (resultados em anexo I).

Para mimetizar uma condição de estresse imunológico, estimularam-se as células em cultura com LPS. O LPS é uma molécula encontrada na parede de bactérias Gram-negativas e amplamente utilizada em estudos de respostas inflamatória e imunológica, pois tem a capacidade de ativar diversas células e induzir a produção de citocinas, bem como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Este estímulo é dependente de vias de sinalização que culminam com a ativação direta de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e indireta de STAT-3 , através de citocinas produzidas pela via do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (RIETSCHEL et al., 1994; CAMPBELL et al., 2006).

Nesta etapa do trabalho notou-se que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ juntamente com o estímulo de 2 horas de LPS não prejudicou a viabilidade celular das CTMs em cultura, além disso, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ alterou a proliferação celular, aumentando a porcentagem de células na fase S/G2/M, bem como a taxa de proliferação das CTMs em cultura.

A ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre o ciclo celular de CTMs derivadas de tecido adiposo já foi descrita na literatura anteriormente (Deezagi and Shomali, 2018). Ademais, outros estudos também relataram a capacidade da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em estimular a proliferação de outros tipos celulares, tais como células endometriais bovinas (Zhang et al., 2017),

células de musculo esquelético (Horsley and Pavlath, 2003) e mioblastos bovinos (Leng and Jiang, 2019).

O NFκB é um fator de transcrição onipresente que regula a transcrição de vários genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias (Yaghooti et al., 2019). Avaliamos a expressão do gene NFκB e a fosforilação de proteínas; em ambas as análises, os resultados mostraram diminuição da expressão de NFκB quando células C3H10T1/2 foram estimuladas com PGF_{2α} e LPS se comparadas com células estimuladas apenas com LPS.

Esses resultados são corroborados pela produção reduzida de IL1β, que é uma citocina pró-inflamatória bem conhecida (Ebrahim et al., 2018). Alguns estudos também revelaram efeitos anti-inflamatórios da PGF_{2α} em outros tipos e modelos de células: suprimindo a permeabilidade vascular em um modelo induzido por doença crônica de granuloma; sendo capaz de reduzir a expressão lútea de TNF-α e também não aumentando a expressão conjuntival de HLA-DR (marcador inflamatório) (Furtado et al., 2012; Hernandez et al., 2009; Ohuchi et al., 1977). Além disso, nosso modelo também mostrou uma produção reduzida do fator estimulador de colônias de granulócitos/ macrófagos (GM-CSF). O GM-CSF é um fator geralmente reconhecido como citocina inflamatória, além de suas várias atividades hematopoiéticas. A literatura sugere que o GM-CSF causa ou faz parte de uma resposta inflamatória (El-Behi et al., 2011; van Nieuwenhuijze et al., 2013).

A despeito de não existir um consenso na literatura, sabe-se que o PGF_{2α} é capaz de ativar direta ou indiretamente a via de sinalização de NFκB em alguns tecidos (Aten et al., 1998; Taniguchi et al., 2010). Alguns estudos mostraram que durante os processos inflamatórios os níveis de PGF_{2α} aumentam no endométrio (Giri et al., 1991; Herzog et al., 2012; Lüttgenau et al., 2016; Miyamoto et al., 2000; Skarzynski et al., 2000). Adicionalmente, foi relatado que o PGF_{2α} pode estimular a produção de IL-6 nas células MC3T3-E1 (do tipo osteoblasto). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com um papel fundamental em vários processos, incluindo a regulação da resposta imune, promovendo a diferenciação de células B, a ativação de células T e a indução de proteínas de fase aguda (Annamalai and Clipstone, 2014; Minamitani et al., 2008; Tokuda et al., 1999). Embora a literatura possa entrar em conflito com

relação à ação do $\text{PGF}_{2\alpha}$ na inflamação, é necessário considerar as diferentes concentrações, tempo de estimulação, tecidos e/ou animais e ainda linhagens celulares presentes em cada estudo.

Além das propriedades de célula tronco, as CTMs também têm demonstrado possuir amplas capacidades imunorreguladoras e são capazes de influenciar as respostas imunes adaptativas e inatas. As descobertas recentes demonstraram que os CTMs interagem ativamente com componentes do sistema imune inato e que, através dessas interações, eles exibem tanto efeitos anti-inflamatórios quanto efeitos pró-inflamatórios (Bernardo and Fibbe, 2013; Keating, 2012; Kyurkchiev et al., 2014; Le Blanc and Mougiakakos, 2012; Prockop and Oh, 2012; Vizoso et al., 2017). As CTMs modulam a atividade de células do sistema imune e a produção de fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; SHI et al., 2010; BAIGUERA et al., 2012).

Visto que CTM são capazes de modular células imunológicas através da secreção de fatores solúveis, buscou-se identificar possíveis efeitos do sobrenadante das CTMs previamente cultivadas com 9M de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sobre a proliferação de macrófagos e de linfócitos, bem como sobre a produção de citocinas por essas células.

Os efeitos observados, tanto na proliferação celular quanto na produção de $\text{TNF}\alpha$, IL-10 e IL-1 β pelos macrófagos, não podem ser atribuídos a presença da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no meio de cultura, mas sim ao meio condicionado das CTMs, em si. Sendo que há uma diminuição nos níveis de $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 β , ao passo que os níveis de IL-10 aumentam quando comparamos os meios condicionados com LPS com o grupo somente com o estímulo de LPS.

Essa capacidade anti-inflamatória das CTMs já está bem documentada na literatura (Choi et al., 2011; Eggenhofer and Hoogduijn, 2012; Griffin et al., 2010; Inoue et al., 2017; Najar et al., 2010). Os macrófagos são células chaves no início e controle da inflamação e que as CTMs podem influenciar a função dos macrófagos dependendo do contexto inflamatório. Os monócitos que chegam a um ambiente inflamatório podem desenvolver-se em macrófagos M1 ativados ou converter em macrófagos M2 alternativamente ativados, dependendo do microambiente

(MANTOVANI et al., 2013). Estudos demonstraram que a co-cultura de monócitos com CTMs da medula óssea promove a formação de macrófagos M2 (EGGENHOFER e HOOGDUIJN, 2012), e isso depende do contato celular e de fatores solúveis, incluindo PGE_2 e catabólitos da atividade IDO como kynurenine (NÉMETH et al., 2009; EGGENHOFER e HOOGDUIJN, 2012). Além disso a literatura relata que macrófagos murinos (RAW 264.7) tiveram a secreção de citocinas inflamatórias diminuídas por CTMs após estímulo com zymosan (CHOI et al., 2011) e IL-1 α (ORTIZ et al., 2007).

Embora nenhuma diferença significativa na atividade dos macrófagos possa ser atribuída à presença de $PGF_{2\alpha}$ no meio de cultura das células C3H10T1/2, os linfócitos cultivados neste meio aumentaram sua produção de IL-10. A IL-10 é uma citocina bem conhecida, capaz de exercer um efeito protetor contra a inflamação devido à regulação negativa generalizada de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- α e IL-6 (Bean et al., 1993; Gérard et al., 1993; Sun et al., 2019)

Da mesma forma, já está bem descrito na literatura o papel imunossupressor das CTMs em linfócitos (Abumaree et al., 2017; Gazdic et al., 2015). Um estudo recente constatou o aumento tanto de IL-1 β quanto de IL-10 em co-culturas de células mononucleares e CTMs, entretanto, o aumento de IL-1 β foi de 3-5 vezes enquanto que o aumento da IL-10 foi de 65-75 vezes, dependendo do clone (Martínez-Peinado et al., 2018). Apesar da diferença não ser tão pronunciada assim, em nossos resultados também encontramos um aumento maior da IL-10 quando comparadas as demais citocinas.

A literatura, em relação a ação da $PGF_{2\alpha}$ em linfócitos, também é escassa. Entretanto, um estudo de 1999 demonstrou a expressão do RNAm da PGFS (prostaglandina F sintase) em linfócitos do sangue periférico (Suzuki-Yamamoto et al., 1999). Além disso, em 1983 foi observado que a administração de $PGF_{2\alpha}$ em mulheres grávidas saudáveis aumentam a atividade citotóxica de linfócitos, enquanto que in vitro a atividade citotóxica dos linfócitos cultivados na presença da $PGF_{2\alpha}$ só aumentou na ausência da progesterona (Szekeres-Barthó et al., 1983). Ademais, estudos mais recentes continuam relacionando a $PGF_{2\alpha}$ e os linfócitos um estudo demonstrou que a co-cultura de células luteais e linfócitos após a administração de $PGF_{2\alpha}$ possui maior proliferação de linfócitos quando comparadas as células retiradas

previamente a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Cannon et al., 2003). Outro estudo relata que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a adesão de células T na ausência de citocinas de células endoteliais lúteas (Walusimbi et al., 2017).

6.0 Conclusão

No presente estudo, apesar dos efeitos da estimulação com $\text{PGF}_{2\alpha}$ na alterarem a capacidade das células C3H10T1/2 em modular células imunes, os resultados mostraram variações modestas nos parâmetros avaliados. Algumas limitações deste estudo devem ser observadas. Primeiro, o modelo foi baseado em linhagens de cultura de células e em experimentos exclusivamente *in vitro*. Segundo, os parâmetros avaliados não refletem todos os mecanismos que podem modular a resposta imune; o potencial do $\text{PGF}_{2\alpha}$ em modular outros parâmetros imunes não pode ser descartado.

Diante dos dados analisados, conclui-se que a $\text{PGF}_{2\alpha}$, em uma concentração de $2 \times 10^{-9}\text{M}$, foi capaz de aumentar a taxa de proliferação de células C3H10T1/2, diminuir a expressão do gene NFkB, bem como a via de ativação para este fator de transcrição, reduzir a produção de $\text{IL}1\beta$ e GM-CSF e modular linfócitos, aumentando a produção de IL-10 por parte destas células. O conhecimento do mecanismo de ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas CTM permanece escasso e são necessários mais estudos para melhorar compreensão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abumaree, M.H., Abomaray, F.M., Alshabibi, M.A., AlAskar, A.S., Kalionis, B., 2017. Immunomodulatory properties of human placental mesenchymal stem/stromal cells. *Placenta* 59, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.04.003>.
- Agas, D., Marchetti, L., Hurley, M.M., Sabbieti, M.G., 2013. Prostaglandin F2 α : a bone remodeling mediator. *J. Cell. Physiol.* 228, 25–9. <https://doi.org/10.1002/jcp.24117>.
- ANNAMALAI, Damodaran, e Neil A. Clipstone. 2014. “Prostaglandin F2 α Inhibits Adipogenesis Via an Autocrine-Mediated Interleukin-11/Glycoprotein 130/STAT1-Dependent Signaling Cascade: PGF2 α Inhibits Adipogenesis Via Gp130/STAT1”. *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (7): 1308–21. <https://doi.org/10.1002/jcb.24785>.
- ARCHER, S. (1993). "Measurement of nitric oxide in biological models." *Faseb J* 7(2): 349-60.
- Aten, R.F., Kolodecik, T.R., Rossi, M.J., Debusscher, C., Behrman, H.R., 1998. Prostaglandin f2alpha treatment in vivo, but not in vitro, stimulates protein kinase C-activated superoxide production by nonsteroidogenic cells of the rat corpus luteum. *Biol. Reprod.* 59, 1069–76. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1069>.
- ATLI, Mehmet O., Robb W. Bender, Vatsal Mehta, Michele R. Bastos, Wenxiang Luo, Chad M. Vezina, e Milo C. Wiltbank. 2012. “Patterns of Gene Expression in the Bovine Corpus Luteum Following Repeated Intrauterine Infusions of Low Doses of Prostaglandin F2alpha1”. *Biology of Reproduction* 86 (4).

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.094870>.

AUGELLO, A., R. Tasso, et al. (2005). "Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway." *Eur J Immunol* 35(5): 1482-90.

BAIGUERA, S.; Jungebluth, P.; Mazzanti, B.; Macchiarini, P. Mesenchymal stromal cells for tissue-engineered tissue and organ replacements. *Transpl Int*, v. 25, n. 4, p. 369-82, Apr 2012. ISSN 0934-0874.

BARRY, F. P., J. M. Murphy, et al. (2005). "Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft." *Stem Cells Dev* 14(3): 252-65.

BARRY, F. P.; Murphy, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 36, n. 4, p. 568-84, Apr 2004. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725.

Bean, A.G., Freiberg, R.A., Andrade, S., Menon, S., Zlotnik, A., 1993. Interleukin 10 protects mice against staphylococcal enterotoxin B-induced lethal shock. *Infect. Immun.* 61, 4937–9.

BERNARDO, Maria Ester, e Willem E. Fibbe. 2013. "Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation". *Cell Stem Cell* 13 (4): 392–402.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>.

BERTAN CM, Binelli M, Madureira EH, Traldi AS. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação de corpo lúteo e na luteólise – revisão de literatura. *Braz J Vet*

Res Anim Sci, v.43, p.824-840, 2006.

BIANCO, P.; Robey, P. G.; Saggio, I.; Riminucci, M. "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, v. 21, n. 9, p. 1057-66, Sep 2010. ISSN 1557-7422 (Electronic) 1043-0342.

CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J.; BROOLING, J. T.; BAUER, R. L.; MITCHELL, C.; FAUSTO, N. Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. J Immunol, v. 176, n. 4, p. 2522- 8, Feb 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

Cannon, M.J., Petroff, M.G., Pate, J.L., 2003. Effects of prostaglandin F2alpha and progesterone on the ability of bovine luteal cells to stimulate T lymphocyte proliferation. Biol. Reprod. 69, 695–700. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017590>.

CASIMIR, D. A.; Miller, C. W.; Ntambi, J. M. Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoide FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells. Differentiation; Research in Biological Diversity, v. 60, n. 4, p. 203–210, jul. 1996.

CHEN, L.; Tredget, E. E.; Wu, P. Y.; Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. PLoS One, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008. ISSN 1932-6203.

CHOI, H, Lee, RH, Bazhanov, N, Oh, JY and Prockop, DJ (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. Blood 118: 330–338.

- COLEMAN, R.A., Kennedy, I., Humphrey, P.P.A., Bunce, K., Lumley, P., 1990. Prostanoids and their receptors. In: Emmett, J.C. (Ed.), *Comprehensive Medicinal Chemistry Membranes and Receptors*, vol. 3. Pergamon, Oxford, UK, pp. 643–714.
- COLEMAN, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S., 1994. Seventh international union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46, 205–229.
- CORCIONE, A., F. Benvenuto, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions." *Blood* 107(1): 367-72.
- CUNNINGHAM, J.G.; Klein, B.G.; *Tratado de Fisiologia Veterinária*. 4ª ed. Rio de Janeiro, RJ, Editora: Elsevier, 2008.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; Caplan, A. I.; Nardi, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 26, n. 9, p. 2287-99, Sep 2008. ISSN 1066-5099.
- DAZZI, F.; Lopes, L.; Weng, L. Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'? *Immunology*, v. 137, n. 3, p. 206-13, Nov 2012. ISSN 0019-2805.
- DEEZAGI, A., Shomali, S., 2018. Prostaglandin F-2 α Stimulates The Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor and Induces Cell Proliferation and Migration of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell J.* 20, 259–266.
<https://doi.org/10.22074/cellj.2018.5026>
- DUFFY, M. M.; Pindjakova, J.; Hanley, S. A.; Mccarthy, C.; Weidhofer, G. A.; Sweeney, E.

- M.; English, K.; Shaw, G.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Mahon, B. P.; Belton, O.; Ceredig, R.; Griffin, M. D. 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*, v. 41, n. 10, p. 2840-51, Oct 2011. ISSN 0014-2980.
- Ebrahim, N., Mostafa, O., El Dosoky, R.E., Ahmed, I.A., Saad, A.S., Mostafa, A., Sabry, D., Ibrahim, K.A., Farid, A.S., 2018. Human mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles/estrogen combined therapy safely ameliorates experimentally induced intrauterine adhesions in a female rat model. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 175.
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0924-z>.
- EGGENHOFER, E., and Hoogduijn, M.J. (2012). Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transp. Res.* 1, 12.
- El-Behi, M., Ciric, B., Dai, H., Yan, Y., Cullimore, M., Safavi, F., Zhang, G.-X., Dittel, B.N., Rostami, A., 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.* 12, 568–75.
<https://doi.org/10.1038/ni.2031>.
- ENGLISH, K., J. M. Ryan, et al. (2009). "Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+ CD25 (High) forkhead box P3+ regulatory T cells." *Clin Exp Immunol* 156(1): 149-60.
- FONSECA, AM; Bagnoli, VR; Arie, WMY & Pinotti, JA - Dismenorréia. *RBM - Rev. Bras. Med.* 2001; 58 : 1-3.

FONSECA, AM; Bagnoli, VR; Diegoli, MSC; Diegoli, CA & Pinotti, JA - Dismenorréia.

RBM - Rev. Bras. Med. 1997; 54 (edição especial): 44-51.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, v. 4, n. 5, p. 267- 74, Sep 1976. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X.

FUJIMORI, K. et al. Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2alpha synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 12, p. 8880–8886, 19 mar. 2010.

FURTADO, João Marcello, Jayter Silva Paula, Edson Garcia Soares, Neifi Hassam Saloum Dhegaide, Eduardo Melani Rocha, Eduardo Donadi, e Maria de Lourdes Veronese Rodrigues. 2012. “Conjunctival inflammation in patients under topical glaucoma treatment with indication to surgery”. *Acta Cirurgica Brasileira* 27 (10): 732–35.
<https://doi.org/10.1590/S0102-86502012001000011>.

Gazdic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N., Stojkovic, M., 2015. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem cell Rev. reports* 11, 280–7.
<https://doi.org/10.1007/s12015-014-9583-3>.

Gérard, C., Bruyns, C., Marchant, A., Abramowicz, D., Vandenabeele, P., Delvaux, A., Fiers, W., Goldman, M., Velu, T., 1993. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* 177, 547–50.
<https://doi.org/10.1084/jem.177.2.547>.

GIRI, S. N., G. H. Stabenfeldt, T. A. Moseley, T. W. Graham, M. L. Bruss, R. H. BonDurant,

- J. S. Cullor, e B. I. Osburn. 1991. "Role of Eicosanoids in Abortion and Its Prevention by Treatment with Flunixin Meglumine in Cows during the First Trimester of Pregnancy". Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe A 38 (6): 445–59.
- Gomzikova, M.O., James, V., Rizvanov, A.A., 2019. Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells Derived Extracellular Vesicles for Immunomodulation. Front. Immunol. 10, 2663. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02663>.
- GONZÁLEZ, F.H. & Silva, S.C. Bioquímica Clínica de Lipídios - As prostaglandinas. In: Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 76-77.
- GRIFFIN, M. D., T. Ritter, et al. (2010). "Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies." Hum Gene Ther 21(12): 1641-55.
- GRONTHOS, S.; et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J. Dent. Res., v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.
- GUPTA, Rajnish A., e Raymond N. DuBois. 2001. "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2". Nature Reviews Cancer 1 (1): 11–21. <https://doi.org/10.1038/35094017>.
- HAYAISHI O, Watanabe K, Fujii Y, et al. Prostaglandin F synthetase, a dual function enzyme. Prog Clin Biol Res 1988; 274:577–87.
- HERNANDEZ, Fatima, Marina C. Peluffo, Diana Bas, Richard L. Stouffer, e Marta Tesone. 2009. "Local Effects of the Sphingosine 1-Phosphate on Prostaglandin F₂α-Induced Luteolysis in the Pregnant Rat". Molecular Reproduction and Development 76 (12):

1153–64. <https://doi.org/10.1002/mrd.21083>.

HERZOG, K., K. Struve, J. P. Kastelic, M. Piechotta, S. E. Ulbrich, C. Pfarrer, K. Shirasuna, T. Shimizu, A. Miyamoto, e H. Bollwein. 2012. “Escherichia Coli Lipopolysaccharide Administration Transiently Suppresses Luteal Structure and Function in Diestrous Cows”. *Reproduction* 144 (4): 467–76. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0138>.

HOCKING, A. M.; Gibran, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, v. 316, n. 14, p. 2213-9, Aug 15 2010. ISSN 1090-2422 (Electronic) 0014-4827.

HORSLEY, V., Pavlath, G.K., 2003. Prostaglandin F2(alpha) stimulates growth of skeletal muscle cells via an NFATC2-dependent pathway. *J. Cell Biol.* 161, 111–8. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208085>.

Inoue, M., Yamada, J., Aomatsu-Kikuchi, E., Satoh, K., Kondo, H., Ishisaki, A., Chosa, N., 2017. SCRG1 suppresses LPS-induced CCL22 production through ERK1/2 activation in mouse macrophage Raw264.7 cells. *Mol. Med. Rep.* 15, 4069–4076. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6492>.

JAGELS, M. A.; Hugli, T. E. Mechanisms and mediators of neutrophilic leukocytosis. *Immunopharmacology*, v. 28, n. 1, p. 1–18, ago. 1994.

JEZ JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* 1997;326(Pt 3):625–36.

JUNG, H.; Kim, W. K.; Kim Do, H.; Cho, Y. S.; Kim, S. J.; Park, S. G.; Park, B. C.; Lim, H.

- M.; Bae, K. H.; Lee, S. C. Involvement of PTP-RQ in differentiation during adipogenesis of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 383, n. 2, p. 252-7, May 29 2009. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X.
- KANEKO, I. et al. Prostaglandin F(2alpha) regulates cytokine responses of mast cells through the receptors for prostaglandin E. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 367, n. 3, p. 590–596, 14 mar. 2008.
- KASSEM, M.; ABDALLAH, B. M. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res*, v. 331, n. 1, p. 157-63, Jan 2008. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X.
- KATO, N., K. Kitahara, S. R Rittling, K. Nakashima, D. T Denhardt, H. Kurosawa, Y. Ezura, e M. Noda. 2007. “Osteopontin Deficiency Enhances Anabolic Action of EP4 Agonist at a Sub-Optimal Dose in Bone”. *Journal of Endocrinology* 193 (1): 171–82.
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06917>.
- KEATING, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 10, 709–716.
- Kota, D.J., Prabhakara, K.S., Toledano-Furman, N., Bhattarai, D., Chen, Q., DiCarlo, B., Smith, P., Triolo, F., Wenzel, P.L., Cox, C.S., Olson, S.D., 2017. Prostaglandin E2 Indicates Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Traumatic Brain Injury. *Stem Cells* 35, 1416–1430. <https://doi.org/10.1002/stem.2603>.
- Kot, M., Musiał-Wysocka, A., Lasota, M., Ulman, A., Majka, M., 2019. Secretion, migration and adhesion as key processes in the therapeutic activity of mesenchymal stem cells.

Acta Biochim. Pol. 66, 499–507. https://doi.org/10.18388/abp.2019_2895.

KRAMPERA, M., L. Cosmi, et al. (2006). "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 24(2): 386-98.

KRSTIC, A.; Mojsilovic, S.; Jovicic, G.; Bugarski, D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. *Immunol Res*, v. 52, n. 1-2, p. 34- 41, Apr 2012. ISSN 0257-277x.

KURODA, Y.; Kitada, M.; Wakao, S.; Nishikawa, K.; Tanimura, Y.; Makinoshima, H.; Goda, M.; Akashi, H.; Inutsuka, A.; Niwa, A.; Shigemoto, T.; Nabeshima, Y.; Nakahata, T.; Nabeshima, Y.; Fujiyoshi, Y.; Dezawa, M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 19, p. 8639-43, May 11 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424.

Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemmezova, K., Kyurkchiev, S., 2014. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* 6, 552–70.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>.

LE BLANC, K., and Mougiakakos, D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 383–396.

Le Blanc, K., Davies, L.C., 2015. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol. Lett.* 168, 140–6. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.004>

- LEE, M. J. et al. Macrophages regulate smooth muscle differentiation of mesenchymal stem cells via a prostaglandin F₂ α -mediated paracrine mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 32, n. 11, p. 2733–2740, nov. 2012.
- LENG, X., Jiang, H., 2019. Effects of arachidonic acid and its major prostaglandin derivatives on bovine myoblast proliferation, differentiation, and fusion. *Domest. Anim. Endocrinol.* 67, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.12.006>
- LEVY, N., S. Kobayashi, Z. Roth, D. Wolfenson, A. Miyamoto, e R. Meidan. 2000. “Administration of Prostaglandin f(2 Alpha) during the Early Bovine Luteal Phase Does Not Alter the Expression of ET-1 and of Its Type A Receptor: A Possible Cause for Corpus Luteum Refractoriness”. *Biology of Reproduction* 63 (2): 377–82.
- Li, P., Zhao, Y., Ge, L., 2016. Therapeutic effects of human gingiva-derived mesenchymal stromal cells on murine contact hypersensitivity via prostaglandin E2-EP3 signaling. *Stem Cell Res. Ther.* 7, 103. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0361-9>
- LIU, L.; Clipstone, N. A. Prostaglandin F₂ α inhibits adipocyte differentiation via a G α q-calcium-calcieneurin-dependent signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 100, n. 1, p. 161–173, 1 jan. 2007.
- LIVAK, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402- 8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023.
- LÜTTGENAU, J, B Möller, D Kradolfer, O Wellnitz, R M Bruckmaier, A Miyamoto, S E Ulbrich, e H Bollwein. 2016. “Lipopolysaccharide Enhances Apoptosis of Corpus

Luteum in Isolated Perfused Bovine Ovaries in Vitro”. *Reproduction* 151 (1): 17–28.

<https://doi.org/10.1530/REP-15-0281>.

MANTOVANI, Alberto, Subhra K Biswas, Maria Rosaria Galdiero, Antonio Sica, e Massimo

Locati. 2013. “Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and

Remodelling: Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and

Remodelling”. *The Journal of Pathology* 229 (2): 176–85.

<https://doi.org/10.1002/path.4133>.

Martínez-Peinado, P., Pascual-García, S., Roche, E., Sempere-Ortells, J.M., 2018. Differences

of Clonogenic Mesenchymal Stem Cells on Immunomodulation of Lymphocyte Subsets.

J. Immunol. Res. 2018, 7232717. <https://doi.org/10.1155/2018/7232717>

MICHAUD, A. et al. Prostaglandin (PG) F₂ Alpha Synthesis in Human Subcutaneous and

Omental Adipose Tissue: Modulation by Inflammatory Cytokines and Role of the

Human Aldose Reductase AKR1B1. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, p. e90861, 24 mar. 2014.

MIKI, T.; et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, v. 23, n. 10,

p. 1549-1559, 2005.

MILLER, A. M. et al. Modulation of granulopoiesis: opposing roles of prostaglandins F and

E. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 92, n. 6, p. 983–990, dez. 1978.

Minamitani, C., Otsuka, T., Takai, S., Matsushima-Nishiwaki, R., Adachi, S., Hanai, Y.,

Mizutani, J., Tokuda, H., Kozawa, O., 2008. Involvement of Rho-kinase in prostaglandin

F₂alpha-stimulated interleukin-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in

osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 291, 27–32.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.05.011>

MINAMITANI, Chiho, Takanobu Otsuka, Shinji Takai, Rie Matsushima-Nishiwaki, Seiji

Adachi, Yoshiteru Hanai, Jun Mizutani, Haruhiko Tokuda, e Osamu Kozawa. 2008.

“Involvement of Rho-Kinase in Prostaglandin F₂ α -Stimulated Interleukin-6 Synthesis via P38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Osteoblasts”. *Molecular and Cellular Endocrinology* 291 (1–2): 27–32.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.05.011>.

MIYAMOTO, Yoko, Dariusz Jan Skarzynski, e Kiyoshi Okuda. 2000. “Is Tumor Necrosis

Factor α a Trigger for the Initiation of Endometrial Prostaglandin F₂ α Release at

Luteolysis in Cattle?1”. *Biology of Reproduction* 62 (5): 1109–15.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1109>.

NAJAR, M., G. Raicevic, et al. (2010). "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* 264(2): 171-9.

NAKAGAWA, Keisuke, Yuuki Imai, Yoichi Ohta, e Kunio Takaoka. 2007. “Prostaglandin

E2 EP4 Agonist (ONO-4819) Accelerates BMP-Induced Osteoblastic Differentiation”.

Bone 41 (4): 543–48. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.06.013>.

NAUTA, A. J.; Kruisselbrink, A. B.; Lurvink, E.; Willemze, R.; Fibbe, W. E. Mesenchymal

stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived

dendritic cells. *J Immunol*, v. 177, n. 4, p. 2080-7, Aug 15 2006.

NÉMETH, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey,

P.G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., Brown, J.M., et al. (2009). Bone marrow

stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 15, 42–49.

OHUCHI, K., H. Sato, e S. Tsurufuji. 1977. “The Effects of Prostaglandin F2alpha on Vascular Permeability and Collagen and Non-Collagen Protein Synthesis of Preformed Chronic Carrageenin Granuloma in Rats”. *Biochemical Pharmacology* 26 (21): 2049–53.

OLIVEIRA, L. F. Avaliação de células-tronco mesenquimais de medula óssea em ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). 2010. 65 Dissertação Patologia Clínica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

ORTIZ, LA, Dutreil, M, Fattman, C, Pandey, AC, Torres, G, Go, K et al. (2007). Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11002–11007.

PREVOSTO, C.; Zancolli, M.; Canevali, P.; Zocchi, M. R.; Poggi, A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell- lymphocyte interaction. *Haematologica*, v. 92, n. 7, p. 881-8, Jul 2007. ISSN 0390-6078.

PROCKOP, D.J., and Oh, J.Y. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* 20, 14–20.

RASMUSSEN, I., K. Le Blanc, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells." *Scand J Immunol* 65(4): 336-43.

RIETSCHEL, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F.; ET

AL. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function.

Faseb j, v. 8, n. 2, p. 217-25, Feb 1994. ISSN 0892-6638 (Print) 0892-6638.

Rozenberg, A., Rezk, A., Boivin, M.-N., Darlington, P.J., Nyirenda, M., Li, R., Jalili, F., Winer, R., Artsy, E.A., Uccelli, A., Reese, J.S., Planchon, S.M., Cohen, J.A., Bar-Or, A., 2016. Human Mesenchymal Stem Cells Impact Th17 and Th1 Responses Through a Prostaglandin E2 and Myeloid-Dependent Mechanism. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 1506–1514. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0243>

SHI, Y.; Hu, G.; Su, J.; Li, W.; Chen, Q.; Shou, P.; Xu, C.; Chen, X.; Huang, Y.; Zhu, Z.; Huang, X.; Han, X.; Xie, N.; Ren, G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, v. 20, n. 5, p. 510-8, May 2010. ISSN 1001-0602.

SHIRASUNA, Koumei, Kiemi Sasahara, Motozumi Matsui, Takashi Shimizu, e Akio Miyamoto. 2010. “Prostaglandin F2 α Differentially Affects MRNA Expression Relating to Angiogenesis, Vasoactivation and Prostaglandins in the Early and Mid Corpus Luteum in the Cow”. *Journal of Reproduction and Development* 56 (4): 428–36. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-004O>.

SILVESTRIS, F., P. Cafforio, M. De Matteo, N. Calvani, M. A. Frassanito, e F. Dammacco. 2008. “Negative Regulation of the Osteoblast Function in Multiple Myeloma through the Repressor Gene E4BP4 Activated by Malignant Plasma Cells”. *Clinical Cancer Research* 14 (19): 6081–91. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0219>.

Skarzynski, D.J., Okuda, K., 2010. Inter- and intra-cellular mechanisms of prostaglandin

F2alpha action during corpus luteum regression in cattle. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 67, 305–24. <https://doi.org/10.7313/upo9781907284991.025>

SKARZYNSKI, Dariusz J., Yoko Miyamoto, e Kiyoshi Okuda. 2000. “Production of Prostaglandin F₂α by Cultured Bovine Endometrial Cells in Response to Tumor Necrosis Factor α: Cell Type Specificity and Intracellular Mechanisms¹”. *Biology of Reproduction* 62 (5): 1116–20. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1116>.

SPAGGIARI, G. M.; Capobianco, A.; Becchetti, S.; Mingari, M. C.; Moretta, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2- induced NK-cell proliferation. *Blood*, v. 107, n. 4, p. 1484-90, Feb 15 2006. ISSN 0006-4971.

SUGIMOTO, Y., T. Namba, A. Honda, Y. Hayashi, M. Negishi, A. Ichikawa, e S. Narumiya. 1992. “Cloning and Expression of a cDNA for Mouse Prostaglandin E Receptor EP3 Subtype”. *The Journal of Biological Chemistry* 267 (10): 6463–66.

Sun, Y., Ma, J., Li, D., Li, P., Zhou, X., Li, Y., He, Z., Qin, L., Liang, L., Luo, X., 2019. Interleukin-10 inhibits interleukin-1β production and inflammasome activation of microglia in epileptic seizures. *J. Neuroinflammation* 16, 66. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1452-1>.

Suzuki-Yamamoto, T., Nishizawa, M., Fukui, M., Okuda-Ashitaka, E., Nakajima, T., Ito, S., Watanabe, K., 1999. cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett.* 462, 335–40. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01551-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01551-3)

SWENSON, M.J.; Reece, W.O.; Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos. 11^a ed. Rio de Janeiro, RJ, Editora: Guanabara Koogan, Cap.07, p.111-113, 1996.

Szekeres-Barthó, J., Csernus, V., Hadnagy, J., Pacsa, A.S., 1983. Progesterone-prostaglandin balance influences lymphocyte function in relation to pregnancy. Am. J. Reprod. Immunol. 4, 139–41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1983.tb00268.x>.

Taniguchi, K., Matsuoka, A., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Tamura, H., Sugino, N., 2010. Prostaglandin F2 α (PGF2 α) stimulates PTGS2 expression and PGF2 α synthesis through NF κ B activation via reactive oxygen species in the corpus luteum of pseudopregnant rats. Reproduction 140, 885–92. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0240>.

TOKUDA, Haruhiko, Osamu Kozawa, Atsushi Harada, e Toshihiko Uematsu. 1999. “P42/P44 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Involved in Prostaglandin F2 α -Induced Interleukin-6 Synthesis in Osteoblasts”. Cellular Signalling 11 (5): 325–30. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(98\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(98)00048-5).

TRAGGIAI, E., S. Volpi, et al. (2008). "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 26(2): 562-9.

TSAI, Shaw-Jenq, e Milo C. Wiltbank. 1998. “Prostaglandin F2 α Regulates Distinct Physiological Changes in Early and Mid-Cycle Bovine Corpora Lutea1”. Biology of Reproduction 58 (2): 346–52. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.2.346>.

UCCELLI, A., L. Moretta, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells in health and disease." Nat

Rev Immunol 8(9): 726-36.

Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat.

Rev. Immunol. 8, 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>

ULICH, T. R. et al. In vivo induction of neutrophilia, lymphopenia, and diminution of neutrophil adhesion by stable analogs of prostaglandins E1, E2, and F2 alpha. The American Journal of Pathology, v. 124, n. 1, p. 53–58, jul. 1986.

Van Nieuwenhuijze, A., Koenders, M., Roeleveld, D., Sleeman, M.A., van den Berg, W.,

Wicks, I.P., 2013. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. Mol.

Immunol. 56, 675–82. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.002>

Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., Perez-Fernandez, R., 2017. Mesenchymal Stem

Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int.

J. Mol. Sci. 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>.

WAITE AL, Holtan DW, Stormshak F. Changes in bovine luteal progesterone metabolism in response to exogenous prostaglandin F2alfa. Domest Anim Endocrinol, v.28, p.162-171.

2005.

Walusimbi, S.S., Wetzel, L.M., Townson, D.H., Pate, J.L., 2017. Isolation of luteal

endothelial cells and functional interactions with T lymphocytes. Reproduction 153,

519–533. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0578>

WANG, L.; Zhao, Y.; Shi, S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes:

implications for immunotherapy and tissue regeneration. J Dent Res, v. 91, n. 11, p.

1003-10, Nov 2012. ISSN 0022-0345.

Wang, Y., Yan, S., Xiao, B., Zuo, S., Zhang, Q., Chen, G., Yu, Yu, Chen, D., Liu, Q., Liu, Y., Shen, Y., Yu, Ying, 2018. Prostaglandin F₂ α Facilitates Hepatic Glucose Production Through CaMKII γ /p38/FOXO1 Signaling Pathway in Fasting and Obesity. *Diabetes* 67, 1748–1760. <https://doi.org/10.2337/db17-1521>.

WATABE, A., Y. Sugimoto, A. Honda, A. Irie, T. Namba, M. Negishi, S. Ito, S. Narumiya, e A. Ichikawa. 1993. “Cloning and Expression of CDNA for a Mouse EP1 Subtype of Prostaglandin E Receptor”. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (27): 20175–78.

WATABE, T.; Miyazono, K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res*, v. 19, n. 1, p. 103-15, Jan 2009. ISSN 1748-7838 (Electronic) 1001-0602.

WATANABE K, Fujii Y, Nakayama K, et al. Structural similarity of bovine lung prostaglandin F synthase to lens epsilon-crystallin of the European common frog. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(1):11–5.

WATANABE MAE, M.A. Ono MA, editors. *Tópicos em Patologia Experimental*. Londrina (PR), Brasil: EDUEL -Universidade Estadual de Londrina; 2008.

Wen, Y.-C., Du, M.-K., Li, M.-W., Hsuan, Y.C.-Y., Su, Y.-C., Lin, W., 2018. EphA2-positive human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells exert anti-fibrosis and immunomodulatory activities via secretion of prostaglandin E2. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 57, 722–725. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.08.020>

WILLIAM Llewellyn's ANABOLICS, 10th ed., 2011.

Yaghooti, H., Mohammadtaghvaei, N., Mahboobnia, K., 2019. Effects of palmitate and astaxanthin on cell viability and proinflammatory characteristics of mesenchymal stem cells. *Int. Immunopharmacol.* 68, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.063>.

YANG, R.; LIU, Y.; KELK, P.; QU, C.; AKIYAMA, K.; CHEN, C.; ATSUTA, I.; CHEN, W.; ZHOU, Y.; SHI, S. A subset of IL-17(+) mesenchymal stem cells possesses anti-*Candida albicans* effect. *Cell Res*, v. 23, n. 1, p. 107-21, Jan 2013. ISSN 1001-0602.

Yu, Y., Lucitt, M.B., Stubbe, J., Cheng, Y., Friis, U.G., Hansen, P.B., Jensen, B.L., Smyth, E.M., FitzGerald, G.A., 2009. Prostaglandin F2alpha elevates blood pressure and promotes atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7985–90.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0811834106>

Zhang, S., Liu, B., Gao, L., Mao, W., Fu, C., Duritahala, D., Zhang, N., Zhang, Y., Shen, Y., Cao, J., 2017. Prostaglandin F2 α -PTGFR signalling activation, growth factor expression and cell proliferation in bovine endometrial explants. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 2195–2205. <https://doi.org/10.1071/RD16144>.

ZHANG, W.; Ge, W.; Li, C.; You, S.; Liao, L.; Han, Q.; Deng, W.; Zhao, R. C. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev*, v. 13, n. 3, p. 263-71, Jun 2004. ISSN 1547-3287 (Print) 1547-3287.

ZUK, P.A.; et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, v. 7, p. 211-228, 2001.

ANEXO I

Resultados Suplementares

Material e Métodos

Cultivo da Célula-tronco Mesenquimal

Foram utilizadas culturas de célula-tronco mesenquimal da linhagem C₃H₁₀T_{1/2} (American Type Culture Collection; Rockville, MD). 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.

As culturas foram adicionadas a incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ á 37°C, para proliferação celular e aderência a garrafa. Inicialmente o meio de cultura foi trocado após 3 ou 4 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 o período de proliferação celular as células foram cultivadas na concentração de 1x10⁶ células/ml por 24 horas na presença ou ausência de 2x10⁻⁹ M de PGF_{2α} [17-phenyl trinor prostaglandin F_{2α}, - Cayman Chemicals, Michigan, USA].

Deteção, por imunofluorescência, do receptor de prostaglandina F (FP)

As células foram cultivadas como descrito acima, após o tempo de cultivo o meio foi removido e as células foram fixadas em tampão PBS contendo 4% paraformaldeído pH7,4, durante 10 minutos à TA. As células foram permeabilizadas com solução 0,1% Triton-X (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) preparada em tampão

PBS contendo 1% de BSA, pH 7,4, durante 1 hora à temperatura ambiente (TA). As células foram lavadas seis vezes. O anticorpo primário do receptor FP (Catálogo 101802 - Cayman) diluído 1:100 em PBS contendo 1% albumina sérica bovina (BSA) foi adicionado sobre cada poço e incubado durante 12 horas em câmara úmida à 4° C e posteriormente lavados seis vezes durante 5 minutos em cada incubação em TA e novamente lavados seis vezes com PBS 1% BSA. O anticorpo secundário anti coelho conjugado ao fluoróforo PE foi diluído 1:200 em PBS 1% BSA e adicionado sobre cada corte. Após 1 hora de incubação à TA, os poços foram lavados seis vezes em solução salina fosfato (PBS) contendo 1% de BSA pH7,4. Para coloração dos núcleos, adicionou-se 1µM 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos e, a seguir, as lâminas foram lavadas uma vez com PBS. Como controle negativo, um dos cortes foi incubado apenas com o anticorpo secundário. Os cortes foram analisados imediatamente em microscópio de fluorescência modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão). A leitura da fluorescência do DAPI foi realizada com o filtro UV-2EC, cujo espectro de emissão é de 325 a 375nm e o de excitação, de 435 a 485nm. Em seguida, foi realizada a aquisição da fluorescência PE em filtro Y-2E/C, cujo espectro de excitação é de 540 a 580nm e o de emissão é de 600 a 660nm. Os tempos de exposição foram os mesmos para ambos os grupos.

Dosagem do Óxido Nítrico

A quantificação do NO• foi realizada no sobrenadante das CTM, pela técnica de quimioluminescência de alta sensibilidade na detecção da molécula, com uso do aparelho de análise NOATM 280 (Sievers Instruments, Inc. Boulder). Esta técnica foi previamente descrita por Archer (Archer, 1993) e basicamente baseia-se na redução

equimolar dos metabólitos estáveis do NO•, o nitrito e nitrato (NO₃⁻), contidos nas amostras a partir da reação destes com vanádio. O NO•, na forma de gás (dióxido de nitrogênio), reage com ozônio resultando na emissão de luz. Os fótons liberados a partir da reação, na região do espectro do infravermelho, são detectados através de tubos fotomultiplicadores do aparelho e transformados em sinal elétrico. A leitura destes dados foi processada utilizando o “software” NOAnalysis™ e os resultados são fornecidos em µM de nitrito/nitrato. A sensibilidade do NOA para a medida do NO• em fase gasosa é de aproximadamente 1 picomol.

Determinação da expressão dos genes de interesse

As células foram cultivadas como descrito acima e a determinação da expressão dos genes PTGFR, AKR1B3, SP7, SPP1, (Tabela 1) foi feita por PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*® (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e os ensaios foram conduzidos no equipamento *A&B StepOne Plus Real-Time PCR System*® (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Neste sistema, a amplificação é avaliada por monitoramento contínuo da fluorescência de cada amostra, entre 520 e 660 nm, de forma que a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA presente na amostra. Estes dados são traduzidos por um software específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa (HIRAYAMA et al., 2008).

O volume total de reação de 10 µl foi composto de 1,0 µL de cDNA, 5,0 µl de *TaqMan® Fast Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 0,5 µl de cada iniciador (sense e antisense) – marcado com sonda FAM e referência passiva ROX – e 3,5 µl de água livre de DNase e RNase. As condições de ciclagem foram: pré-incubação por 2,0 minutos a 50°C e por 20 segundos a 95°C para desnaturação das dupla-fitas de cDNA, seguido de 40 ciclos de 01 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C.

Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ctv., que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula: Taxa de expressão relativa = $2^{-(Cg \text{ amostra} - mct. \text{ calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. Como calibrador, foi utilizada a média aritmética do ΔCt das CTM do grupo Controle, empregada como base para resultados comparativos. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos.

Tabela 3: Características dos ensaios TaqMan® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real resultados do anexo I.

Nome do gene	Símbolo do gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Receptor de prostaglandina F2 alpha	PTGFR	<i>Mus musculus</i>	Mm00436055_m1	132
Aldo-ceto redutase Família 1 Membro B3	AKR1B3	<i>Mus musculus</i>	Mm03047802_g1	85
Sp7 Fator Transcrição	SP7	<i>Mus musculus</i>	Mm04209856_m1	88
Fosfoproteína Secretada 1	SPP1	<i>Mus musculus</i>	Mm00436767_m1	114
18S RNA Ribossomal	RN18S	<i>Mus musculus</i>	Mm03928990_g1	61

pb: pares de bases

Resultados

Detecção, por imunofluorescência, do receptor FP

A marcação para receptor FP (coloração vermelha) foi positiva para a região citoplasmática das CTMs em cultura. Não havendo grandes diferenças nas marcações entre os grupos (**Figura 1 A e B**).

Figura 1. Fotomicrografias de CTMs (A) CTMs cultivadas com DEMEM, (B) CTMs cultivadas na presença de $\text{PGF}_{2\alpha}$, (C) CTMs cultivadas na presença de LPS, (D) CTMs cultivadas na presença de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e LPS marcadas por imunofluorescência para receptor FP (vermelho) e DAPI (azul), aumento de 10x. Imagens obtidas com aplicação de filtros UV-2EC para leitura do DAPI e Y-2EC para leitura do PE em microscópio de fluorescência modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

Dosagem de NO

A avaliação do NO presente no sobrenadante celular revelam que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não interferiu na concentração de NO após o período de cultura estudado.

Figura 2. Resultados da dosagem de NO com o estímulo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante 24 horas. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). (n=8).

Expressão de RNAm de PTGFR, AKR1B3, SP7, SPP1 em CTMs

Após o período de cultura celular foram realizadas a expressão dos genes PTGFR, AKR1B3, SP7 e SPP1 e não foram observadas diferenças estatísticas nesses parâmetros avaliados.

Figura 3. Resultados da expressão gênica das CTMs cultivadas na presença de PGF_{2α}. A) Expressão de PTGFR. B) Expressão de AKR1B3. C) Expressão de SP7. D) Expressão de SPP1. Resultados representam a média da expressão dos genes das CTMs em cultura com PGF_{2α} durante 24 horas. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DPM).

ANEXO II

Amino Acids (2019) 51:451–462
<https://doi.org/10.1007/s00726-018-2679-3>

ORIGINAL ARTICLE

Exogenous glutamine impairs neutrophils migration into infections sites elicited by lipopolysaccharide by a multistep mechanism

Andressa Cristina Antunes Santos¹ · Cristina Bichels Hebeba¹ · Araceli Aparecida Hastreiter¹ · Dalila Cunha de Oliveira¹ · Edson Naoto Makiyama¹ · Sandra Helena Poliselli Farsky¹ · Primavera Borelli¹ · Ricardo Ambrosio Fock¹

Received: 17 July 2018 / Accepted: 9 November 2018 / Published online: 17 November 2018
 © Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

Glutamine (GLN) is the most abundant free amino acid in the body, and is considered as a conditionally essential amino acid under stress conditions, acting as an important modulator of the immune response. We here investigated the role of exogenous GLN treatment on leukocyte migration after the onset of endotoxemia and the intracellular mechanisms of GLN actions on neutrophils. Two in vivo models of endotoxemia caused by lipopolysaccharide of *Escherichia coli* (LPS) injection were carried out in male outbred Balb/C mice 2–3 months old, as follow: (1) LPS (50 µg/kg) was intravenously injected 1 h prior to intravenous injection of GLN (0.75 mg/kg) and samples were collected 2 h later to investigate the role of GLN on the acute lung inflammation; (2) LPS (1 mg/kg) was intraperitoneally injected 1 h prior to intravenous injection of GLN (0.75 mg/kg) and samples were collected 18 h later to measure the effects of GLN on local and later phases of inflammation in the peritoneum. Results showed that GLN administration reduced the number of neutrophils in the inflamed lungs, partially recovery of the reduced number of leukocytes in the blood; reduced adhesion molecules on lung endothelium and on circulating neutrophils. Moreover, GLN treatment diminished the number of neutrophils, levels of chemotactic cytokine CXCL2 in the inflamed peritoneum, and neutrophils collected from the peritoneum of GLN-treated mice presented lower levels of Rho, Rac, and JNK. Together, our data show novel mechanisms involved in the actions of GLN on neutrophils migration.

Keywords Glutamine · Inflammation · Neutrophils · Migration · CD11b/CD18

ANEXO III

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

CEUA/FCF 006.2018-P554

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da ação combinada de EPO, G-CSF, GM-CSF e IL-3 na modulação da hematopoese em camundongos desnutridos**, registrada com o nº **554**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock**, sob orientação do(a) – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **09 de março de 2018**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/03/2018 a 30/11/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Número de animais	40
Peso/Idade	25g; 45 a 60 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério - USP

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

São Paulo, 09 de março de 2018.

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora da CEUA/FCF/USP

ANEXO IV

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 8720001/1 - Andressa Cristina Antunes Santos

Email:	andressaantunes@usp.br
Data de Nascimento:	10/02/1991
Cédula de Identidade:	RG - 38.926.864-1 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Centro Universitário Lusíada - Fundação Lusíada - São Paulo - Brasil - 2013
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2016

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	07/04/2016
Início da Contagem de Prazo:	07/04/2016
Data Limite para o Depósito:	07/04/2020
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 04/01/2018 até o presente. Email: hemato@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/04/2016

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/05/2018

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/04/2016

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2020

Impresso em: 28/02/2020 19:48:00

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 8720001/1 - Andressa Cristina Antunes Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5766-4/3	Tópicos em Análises Clínicas IV	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	11/08/2016	19/10/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5727-4/2	Tópicos Avançados da Imunidade Inata Induzida por Fungos Patogênicos	07/11/2016	12/12/2016	60	4	100	B	N	Concluída
FBC5792-4/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	07/03/2017	19/06/2017	15	1	89	A	N	Concluída
FBC5805-1/1	Lógica e Filosofia da Ciência	28/03/2017	10/07/2017	90	6	90	A	N	Concluída
ICB5711-3/2	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/08/2017	04/09/2017	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5734-3/2	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	20/08/2018	26/08/2018	30	2	100	A	N	Concluída
QBQ5747-11/4	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	27/08/2018	02/09/2018	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5954-1/2	Redação de Trabalhos Científicos	11/04/2019	17/04/2019	15	0	-	-	N	Turma cancelada
FBA5756-1/3	Alergia Alimentar	29/04/2019	05/05/2019	30	0	-	-	N	Turma cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	24
Estágios:			
Total:	0	20	24

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2020

Impresso em: 28/02/2020 19:48:01

ANEXO V

Andressa Cristina Antunes Santos

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1448468996510591>

ID Lattes: **1448468996510591**

Última atualização do currículo em 16/10/2019

Mestre em Ciências na área de Hematologia Experimental na Universidade de São Paulo (2016) . Possui graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário Lusíada (2012). Tem experiência na área de análises clínicas, com ênfase em hematologia, atuando em mecanismos de transcrição, inflamação e sinalização celular em um modelo de desnutrição e o papel da glutamina na modulação destes processos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Andressa Cristina Antunes Santos
Nome em citações bibliográficas	ANTUNES, A. C. P.; SANTOS, A. C. A.; SANTOS AC; SANTOS, ANDRESSA CRISTINA ANTUNES
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/1448468996510591

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2016	Doutorado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Influência da prostaglandina F2α sobre as principais funções das células-tronco mesenquimais: Avaliação de aspectos imunoregulatórios e da capacidade de diferenciação. Orientador: Ricardo Ambrósio Fock. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
2014 - 2016	Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeito da desnutrição proteica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular. Papel da glutamina na modulação desses processos, Ano de Obtenção: 2016. Orientador: Ricardo Ambrósio Fock. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2009 - 2012	Graduação em Biomedicina. Centro Universitário Lusíada, UNILUS, Brasil. Título: Efeito protetor e antitumoral do extrato de Ganoderma lucidum em ratos induzidos ao plasmocitoma com droga carcinogênica pristane. Orientador: Edgar Matias Bach HI.

Formação Complementar

2017 - 2017	BASE DE PESQUISA EM SAÚDE. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Brasil.
2017 - 2017	A evolução do sistema imune. Sociedade Brasileira de Imunologia, SBI, Brasil.
2017 - 2017	BD Citometria de Fluxo Multicolor. BD Bioscience, BD, Brasil.
2016 - 2016	I Curso da SBAN de Atualização em Suplementação Alimentar no Exercício e no. (Carga horária: 11h). Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, SBAN, Brasil.
2015 - 2015	
	8º Curso de Citometria de Fluxo. (Carga horária: 40h). Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.
2010 - 2010	Microbiologia alimentar. (Carga horária: 12h). Centro Universitário Lusíada, UNILUS, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - Atual

Vínculo: Aluno de mestrado, Enquadramento Funcional: Aluno, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional

2013 - 2013

Outras informações

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20
Estágio na Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP em Hematologia para ingressar na pós-graduação.

Pref. Munic. Estância Balneária de Peruíbe, PMEBP, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2012

Outras informações

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30
Estágio em análises clínicas no Pronto Socorro Municipal de Peruíbe.

Idiomas

Inglês

Francês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2017	Melhor apresentação oral de trabalho de Mestrado na XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.
-------------	--

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. ★ **SANTOS, ANDRESSA CRISTINA ANTUNES**; HEBEBA, CRISTINA BICHELS ; HASTREITER, ARACELI APARECIDA ; DE OLIVEIRA, DALILA CUNHA ; NAOTO MAKIYAMA, EDSON ; FARSKY, SANDRA HELENA POLISELLI ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, RICARDO AMBROSIO . Exogenous glutamine impairs neutrophils migration into infections sites elicited by lipopolysaccharide by a multistep mechanism. *AMINO ACIDS JCR*, v. 51, p. 451-462, 2018.
2. ★ DE OLIVEIRA, DALILA CUNHA ; DA SILVA LIMA, FABIANA ; SARTORI, TALITA ; **SANTOS, ANDRESSA CRISTINA ANTUNES** ; ROGERO, MARCELO MACEDO ; FOCK, RICARDO AMBROSIO . Glutamine metabolism and its effects on immune response: molecular mechanism and gene expression. *NUTRIRE - REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO*, v. 41, p. 41/14, 2016.
3. ★ **SANTOS, A. C. A.**; CORREIA, C. A. ; OLIVEIRA, D. C. ; NOGUEIRA-PEDRO, A. ; BORELLI, P. ; FOCK, R. A. . Intravenous Glutamine Administration Modulates TNF- α /IL-10 Ratio and Attenuates NFkB Phosphorylation in a Protein Malnutrition Model. *Inflammation JCR*, v. 39, p. 1883, 2016.
Citações: **WEB OF SCIENCE** 2 | **SCOPUS** 1

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ **SANTOS, A. C. A.**; MAKIYAMA, E. N. ; BORELLI, P. ; FOCK, R. A. . The role of glutamine in the modulation of migration and expression of CD11b / CD18 polymorphonuclear cells from mice subjected to protein malnutrition. In: Eric A. Newsholme Research Symposium, 2016, São Paulo. Cadernos de resumo, 2016. v. 3. p. 1-139.

Apresentações de Trabalho

1. **SANTOS, A. C. A.**; Sartori, T. ; MAKIYAMA, E. N. ; BORELLI, P. ; FOCK, R. A. . Glutamina em concentrações supra fisiológicas tem capacidade de modular parâmetros imunológicos in vivo e in vitro em animais com desnutrição proteica. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. ★ **SANTOS, A. C. A.**. Regulação da hematopoiese: sinalização, migração e o papel da glutamina. 2016. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
3. **ANTUNES, A. C. P.**; HI, E. M. B. . Efeito protetor do extrato de *Ganoderma lucidum* em ratos inoculados com droga carcinogênica Pristane. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. HI, E. M. B. ; **ANTUNES, A. C. P.** . Hipertensão e Diabetes. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
5. **ANTUNES, A. C. P.**. Efeito protetor do extrato de *Ganoderma lucidum* em ratos inoculados com droga carcinogênica pristane. 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. **SANTOS, ANDRESSA CRISTINA ANTUNES**. 16ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. 2018. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
2. **SANTOS, A. C. A.**. 15ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. 2017. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
3. **SANTOS, A. C. A.**. VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas (SIMPAC) e II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology.. 2016. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 15º CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO - SBAN. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS RELACIONADAS A RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA EM MODELO DE ENVELHECIMENTO SUBMETIDO A CARÊNCIA PROTEICA. 2019. (Congresso).
2. 15º CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO - SBAN. - A SUPLEMENTAÇÃO DE GLUTAMINA REDUZ A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA LOCAIS DE INFECÇÃO PROVOCADOS PELO ESTÍMULO COM LIPOPOLISSACARÍDEO POR UM MECANISMO DE VÁRIAS ETAPAS. 2019. (Congresso).
3. 15º CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO - SBAN. INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO SOBRE ASPECTOS IMUNOMODULATÓRIOS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS MEDULARES EM SITUAÇÃO DE DESNUTRIÇÃO PROTEICA. 2019. (Congresso).
4. 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. The effect of different prostaglandin F2α concentrations on mesenchymal stem cells.. 2019. (Congresso).
5. 51 st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics. The effect of different prostaglandin F2α concentrations on mesenchymal stem cells.. 2019. (Congresso).
6. I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas ? I ClinTox.Hematopoeese: o microambiente Medular. 2019. (Outra).
7. I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas ? I ClinTox.Eletroforese e Western-Blotting. 2019. (Outra).
8. 27th Italo-latinamerican Asian & African Congress of Ethnomedicine. Effect of the hydroalcoholic extract of Ganoderma lucidum in rats inoculated with Pristane. 2018. (Congresso).
9. 4º Congresso de Graduação. 2018. (Congresso).
10. III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY and VIII SIMPÓSIO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS.PROSTAGLANDIN F2α HAS THE ABILITY TO MODULATE mRNA EXPRESSION OF ANGPT1, PTGFR AND SP7 IN MESENCHYMAL STEM CELLS. 2018. (Simpósio).
11. VIII SIMPÓSIO DE PÓSGRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS ? SIMPAC AND III INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PATHOPHYSIOLOGY AND TOXICOLOGY - ISPAT.PROSTAGLANDIN F2α HAS THE ABILITY TO MODULATE mRNA EXPRESSION OF ANGPT1, PTGFR AND SP7 IN MESENCHYMAL STEM CELLS. 2018. (Simpósio).
12. XVII Simpósio de Biossegurança. 2018. (Simpósio).
13. 3º Congresso de Graduação da USP. 2017. (Congresso).
14. III Workshop em Bioterismo ? Inovação e Capacitação. 2017. (Outra).
15. X SIMPÓSIO SUL DE IMUNOLOGIA.Glutamine evaluation on immunomodulatory aspects of Raw 264.7 cells. 2017. (Simpósio).
16. X SIMPÓSIO SUL DE IMUNOLOGIA.?Glutamine over the physiological concentration has the ability to modulate immune parameters in vivo and in vitro in protein malnourished mice. 2017. (Simpósio).
17. XVI Simpósio de Biossegurança e Segurança Química e Biológica em Instituições de Ensino e Pesquisa. 2017. (Simpósio).
18. XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.Glutamine over the physiological concentration has the ability to modulate immune parameters in vivo and vitro. 2017. (Outra).
19. Eric A. Newsholme Research Symposium.The role of glutamine in the modulation of migration and expression of CD11b / CD18 polymorphonuclear cells from mice subjected to protein malnutrition. 2016. (Simpósio).
20. XI Congresso de Biomedicina da Baixada Santista. Regulação da hematopoeese: sinalização, migração e o papel da glutamina. 2016. (Congresso).
21. 13º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. Papel da glutamina na modulação da migração e na expressão de CD11b/CD18 de células polimorfonucleares de camundongos submetidos a desnutrição proteica. 2015. (Congresso).
22. VII Congresso de Biomedicina da Baixada Santista. 2012. (Congresso).
23. XIII Congresso Brasileiro e Internacional de Biomedicina. 2012. (Congresso).
24. VI Congresso de Biomedicina da Baixada Santista. 2011. (Congresso).
25. VIII Feira da saúde e educação.Feira da saúde. 2009. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **SANTOS, A. C. A.** I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas ? I ClinTox. 2019. (Outra).
2. **SANTOS, A. C. A.**; BATISTA, G. ; HASTREITER, A. A. ; BELTRAN, J. O. . VII Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas(SIMPAC) e II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology.. 2016. (Congresso).
3. **SANTOS, A. C. A.**; HASTREITER, A. A. ; OLIVEIRA, D. C. ; BELTRAN, J. O. ; BATISTA, G. . VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas(SIMPAC) e I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology.. 2015. (Congresso).