UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Influência dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre
aspectos imunoregulatórios das células tronco mesenquimais.

Talita Sartori

Tese para Obtenção de título de Doutor
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Influência dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre
aspectos imunoregulatorios das células tronco mesenquimais.

Talita Sartori

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para Obtenção de título de Doutor
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

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

Sartori, Talita
S251i Influência dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre aspectos
imunoregulatórios das células tronco mesenquimais . / Talita Sartori. --
São Paulo, 2020.
76p.

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. Inflamação : Medicina. 2. Imunologia : Medicina. I. T. II.
Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

616.0473 CDD

Talita Sartori

Influência dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre aspectos
imunoregulatórios das células tronco mesenquimais.

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Regina e Laercio,
pela confiança, apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock** pelos ensinamentos, oportunidade e confiança

À **Prof.^a Dr.^a Primavera Borelli** do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, pela oportunidade e por compartilhar seu vasto conhecimento.

Ao Prof. Dr. Jeferson Russo Victor por todo auxílio e amizade. Minha admiração e respeito pela sua pessoa e pelo seu profissionalismo.

Às amigas verdadeiras que pude fazer dentro do laboratório Andressa Cristina Antunes Santos, Renaira Oliveira e Gabriela Kodja. Vocês foram alicerce essencial para que eu conseguisse continuar. Obrigada por terem confiado em mim.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, sempre atenciosos e solícitos.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para o progresso deste trabalho.

RESUMO

SARTORI, T. **Influência dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre aspectos imunoregulatórios das células tronco mesenquimais.** 2020. 76f. Tese (DOUTORADO) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2020.

Determinadas reações fisiológicas, como a inflamatória, podem intervir na homeostasia. A modulação da resposta inflamatória, alcançada por meio de ativação ou inativação de determinados componentes, visa estabelecer o equilíbrio da resposta imune, de maneira a diminuir suas potenciais consequências deletérias. Os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), que incluem isoleucina, valina e leucina, são amplamente estudados devido sua influência na imunidade. Na mesma linha, as células-tronco mesenquimais (CTMs), por meio da secreção de diversos mediadores solúveis, também apresentam propriedades imunomoduladoras. Sabendo que tanto os ACRs quanto as CTMs apresentam influência sobre a resposta inflamatória, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação dos ACRs em aspectos imunomoduladores das CTMs. As CTMs foram cultivadas em meio suplementado com ACRs, a fim de avaliar a atividade metabólica, ciclo celular, PCNA, PGC1- α , c-Myc, PPAR- γ , NF κ B e expressão de STAT-3 e, ainda, a síntese de alguns mediadores inflamatórios, como: IL1- β , GM-CSF, IL-10, TGF- β , PGE2 e NO. De acordo com nossos resultados, observamos que a suplementação com ACRs levou não apenas ao aumento da proliferação celular com mais células na fase do ciclo G2/S/M, mas também ao aumento da atividade metabólica. Da mesma forma, demonstramos que os ACRs alteraram a capacidade imunomoduladora das CTMs, diminuindo a expressão de NF κ B e aumentando a expressão de STAT-3. Semelhantemente, houve um aumento na síntese de mediadores anti-inflamatórios como TGF- β e PGE2. Além disso, as CTMs cultivadas em meios suplementados com ACRs têm a capacidade de diminuir a produção de TNF- α e IL6 pelos macrófagos. Assim, concluímos que os ACRs são capazes de levar a mudanças em aspectos imunoregulatórios das CTMs.

Palavras-chave: Aminoácidos de cadeia ramificada, célula tronco mesenquimal, macrófagos, linfócitos, citocinas, imunomodulação.

ABSTRACT

SARTORI, T. **Branched chain amino acids influence on immunoregulatory mesenchymal stem cells aspects**.2020. 76f. Tese (DOUTORADO) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo,2020.

Certain physiological reactions, such as inflammatory reactions, can intervene in homeostasis. The modulation of the inflammatory response, achieved by activating or inactivating certain components, aims to establish the balance of the immune response, in order to reduce its potential harmful consequences. The branched-chain amino acids (ACR), which include isoleucine, valine and leucine, are widely studied due to their influence on immunity. In the same vein, mesenchymal stem cells (MSCs), through the secretion of several soluble mediators, also have immunomodulatory properties. Knowing that both ACRs and CTMs have an influence on the inflammatory response, the objective of this study was to evaluate the action of ACRs in some immunomodulatory aspects of CTMs. The MSCs were grown in a medium supplemented with ACRs, in order to evaluate the metabolic activity, cell cycle, PCNA, PGC1- α , c-Myc, PPAR- γ , NF κ B and STAT-3 expression and, also, the synthesis of some inflammatory mediators, such as: IL1- β , GM-CSF, IL-10, TGF- β , PGE2 and NO. According to our results, we observed that supplementation with ACRs led not only to an increase in cell proliferation with more cells in the G2 / S / M cycle phase, but also to an increase in metabolic activity. Likewise, we demonstrated that ACRs altered the immunomodulatory capacity of MSCs, decreasing the expression of NF κ B and increasing the expression of STAT-3. Corroboratively, there was an increase in the synthesis of anti-inflammatory mediators such as TGF- β and PGE2. In addition, MSCs grown in media supplemented with ACRs have the ability to decrease the production of TNF- α and IL6 by macrophages. Thus, we conclude that ACRs are capable of leading to changes in some immunoregulatory aspects of MSCs.

Keywords: Branched-chain amino acids, mesenchymal stem cell, macrophages, lymphocytes, cytokines, immunomodulation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACR** Aminoácido de cadeia ramificada
- AP1** Ativador de proteína 1
- APC** Célula apresentadora de antígeno
- ATACR** Aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada
- BCAA** *Branched chain aminoacids*
- CD** Grupamento de diferenciação
- CTM** Célula tronco mesenquial
- DMEM** Meio Dulbecco modificado
- DNA** Ácido desoxiribonucléico
- ELISA** *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- EDTA** Sal potássio do ácido etileno diaminotetracético
- EROS** Espécies reativas de oxigênio
- HGF** Fator de crescimento de hepatócitos
- HLA-DR** Antígenos leucocitários humanos
- HOCl** Ácido hipoclorico
- H₂O₂** Peróxido de hidrogênio
- IKB α** *Nuclear fator of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*
- IDO** Indoleamina 2,3-dioxigenase
- IKK** Quinase IKB
- IL** Interleucina
- IMDs** Dietas imunomodulatórias
- iNOS** Óxido nítrico sintase
- IRAK** Quinase associada ao receptor de interleucina-1
- IFN- γ** Interferon - γ
- LBP** Proteína ligante de polissacarídeo
- LPS** Lipopolissacarídeo
- MD2** Antígeno linfocítico 96
- MTT** Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ol) -2,5-difeniltetrazólio
- MyD88** “*Myeloid differentiation primary response gene 88*”

NFκB Fator de transcrição nuclear kappa B

NEMO “*NFκB essential modulator*”

NO Óxido nítrico

PAMP Padrões moleculares associados a patógenos

PBS Solução tampão fosfato salina

PCNA *proliferative nuclear cell antigen*

PGC1 α Coativador de receptor ativado por proliferador de peroxissomo 1-alfa

PGN peptideoglicano

PGE₂ Prostaglandina E₂

PPARγ Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama

NFκB Fator de transcrição nuclear kappa B

p-NFκB Fator de transcrição nuclear kappa B, porção fosforilada

RPMI *Roswell Park Memorial Institute medium*

SBF Soro bovino fetal

SDS Dodecil sulfato de sódio

STAT Sinal de transdução e ativação de transcrição

p- STAT Sinal de transdução e ativação de transcrição, porção fosforilada

TBST PBS suplementado com 0,1% Tween 20

TGF-β Fator de transformação do crescimento beta

TLR Receptores do tipo toll

Th1 linfócito T auxiliar tipo 1

Th2 linfócito T auxiliar tipo 2

TNF-α Fator de necrose tumoral alfa

TRAF-6 Fator associado ao receptor de TNF

Treg Linfócito T regulador

TrisHCl Tris hidrocloridro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da estrutura molecular dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR)	17
Figura 2	Efeito modulatório das CTM por meio da síntese de mediadores solúveis.....	20
Figura 3	Plasticidade imunológica das CTMs de acordo com o ambiente em que estão inseridas.....	22
Figura 4	Delinhamento dos grupos experimentais de acordo com as concentrações finais de ACR.....	30
Figura 5	Delineamento dos grupos experimentais para ensaios com cultura de sobrenadante das CTM previamente tratadas com os ACR em macrófagos da linhagem Raw 264.7.....	37
Figura 6	Delineamento dos grupos experimentais para ensaios com cultura com sobrenadante condicionado das CTMs previamente tratadas com os ACR em linfócitos.....	39
Figura 7	Atividade metabólica celular após suplementação com aminoácidos	41
Figura 8	Ciclo celular as CTMs com diferentes suplementações dos aminoácidos.....	42
Figura 9	Influência das diferentes suplementações com aminoácidos no conteúdo proteico da PCNA e na razão p c-Myc/c-Myc.....	43
Figura 10 A e B	Influência das diferentes suplementações com aminoácidos na razão do conteúdo proteico de p-NFKB/NFKB e p-PPAR γ /PPAR γ de CTMs estimuladas com LPS.....	44
Figura 10 C e D	Influência das diferentes suplementações com aminoácidos na razão do conteúdo proteico de p STAT 3/STAT 3 e PGC1 α de CTMs estimuladas com LPS.....	45
Figura 11	Influência das diferentes suplementações com aminoácidos na produção de IL-10, TGF- β , PGE2 e NO em CTMs.....	47
Figura 12	Influência do meio condicionado de CTMS previamente cultivadas com diferentes aminoácidos em atividade metabólica e viabilidade de macrófagos da linhagem Raw 264.7.....	48
Figura 13	Influência do meio condicionado das CTM na produção de IL6, TNF- α e IL-10 por macrófagos da linhagem Raw 264.7.....	50
Figura 14	Influência do meio condicionado das CTMs na produção de IL4, IFN- γ e IL-10 pelos linfócitos.....	51

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
1.1 AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA.....	16
1.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E CAPACIDADE IMUNOMODULATÓRIA.....	19
1.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO e TRANSDUÇÃO DE SINAL.....	23
2. OBJETIVO	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Células da linhagem C ₃ H ₁₀ T _{1/2} e grupos experimentais	29
3.2 Ciclo celular após suplementação com aminoácidos	31
3.3 Atividade metabólica por MTT	31
3.4 Conteúdo proteico de PCNA, PGC1- α , c Myc, PPAR γ , NF κ B, e STAT-3.....	32
3.5 Dosagens de citocinas e PGE ₂ pelas CTM	35
3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO)	35
3.7 Cultura com sobrenadante de CTM em células Raw 264.7	36
3.7.1 Avaliação da atividade metabólica por MTT	37
3.7.2 Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo.....	37
3.7.3 Dosagem de citocinas	38
3.8 Cultura com sobrenadante de CTM em células linfócitos.....	38
3.8.1 Dosagem de citocinas	39
3.9 Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Influência dos diferentes ACR na atividade metabólica.	41
4.2 Influência dos diferentes ACR no ciclo celular das CTM.....	42
4.3 Influência dos ACR no conteúdo proteico de PNCA e c-Myc expression nas CTMs.....	43
4.4 A influência dos diferentes aminoácidos sobre o conteúdo proteico de NF κ B, STAT-3, PPAR- γ , e PGC1- α nas CTM.	44

4.5 A influência dos diferentes ACR na síntese de mediadores solúveis pelas CTM.....	46
4.6 Viabilidade e atividade metabólica de macrófagos da linhagem Raw 264.7 cultivados com sobrenadante de CTMs previamente tratadas com ACRs.....	47
4.7 Síntese de citocinas por macrófagos da linhagem Raw 264.7 cultivadas com sobrenadante de CTMs previamente tratadas com os aminoácidos.	48
4.8 Síntese de citocinas por linfócitos cultivadas com sobrenadante de CTMs previamente tratadas com os aminoácidos.	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO I- TERMO DE ACEITE DO ARTIGO	70
ANEXO II- CURRÍCULO LATTES.....	71
ANEXO III- FICHA DO ALUNO.....	75

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Para manterem-se saudáveis, os organismos necessitam da manutenção do estado de equilíbrio fisiológico, conhecido como homeostasia. Entretanto, algumas respostas biológicas naturais podem levar a desarmonia do sistema, como acontece em reações inflamatórias (HALL, JOHN EDWARD; GUYTON, 2017). Dessa maneira, o propósito de restabelecer o equilíbrio da resposta imune e minimizar as potenciais consequências deletérias provenientes do processo inflamatório, torna-se alvo de estudos.

Dentro deste contexto diversas abordagens são empregadas, como por exemplo a intervenção nutricional. Destacam-se, sob essas circunstâncias, suplementos nutricionais como os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) que compreendem isoleucina, valine e leucina (TOM; NAIR, 2006; CHOW; BARBUL, 2014). Além de apresentarem importância para regulação e manutenção proteica de indivíduos adultos, muitos estudos já demonstraram que os ACR possuem influência na modulação imunológica, tanto na produção de mediadores inflamatórios, quanto na atividade celular (DE BANDT; CYNOBER, 2006). Segundo LEE *et al.*, 2017 macrófagos Raw 264.7 apresentaram redução na produção de citocinas pró inflamatórias, após suplementação com ACRs. De maneira similar, REN *et al.*, 2015, mostraram melhora da condição imunológica intestinal e aumento da produção de anticorpos em leitões desmamados, após suplementação com ACRs.

Seguindo a mesma característica de modulação imunológica, as células tronco mesenquimais (CTMs), desde sua descoberta, obtiveram destaque no meio

científico devido sua capacidade terapêutica, que englobam promoção de angiogênese, prevenção de apoptose e ainda supressão da resposta inflamatória (JIANG; XU, 2020). Segundo diversos autores, as CTMs podem apresentar fenótipos diferentes de acordo com o microambiente ao qual estão inseridas (WANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2012). Por meio da síntese de diversos mediadores solúveis, as CTMs, por ação parácrina, podem modular a ativação e a funcionalidade de algumas células como linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas. Impedindo dessa forma a hiperestimulação imunológica (DE GIROLAMO *et al.*, 2013). Apesar de ainda serem relevantes os questionamentos sobre o real mecanismo de atuação das CTMs sobre a modulação imunológica, essas células já têm sido aplicadas para tratamento de algumas doenças como diabetes, câncer e também doenças autoimunes (JIANG; XU, 2020; CIPRIANI *et al.*, 2013).

Visto que o processo inflamatório, uma vez em desequilíbrio, possa direcionar ao dano tecidual e efeitos sistêmicos deletérios, que ACR possuem efeito imunomodulatório e que as CTMs podem desenvolver perfil pró-inflamatório ou imunossupressor de acordo com a indução inicial do ambiente onde elas estão inseridas, nosso propósito para esse trabalho foi avaliar as possíveis intervenções dos ACR nas características imunomodulatórias das CTMs.

1.1 AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA

Os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR), representados por isoleucina, valina e leucina, fazem parte dos nove aminoácidos essenciais para humanos e constituem aproximadamente um terço das proteínas musculares (HUTSON, HARRIS, 2001; Wu G., 2013). Além de serem precursores de glutamina e alanina, segundo a literatura, esses aminoácidos são responsáveis por aumentar a secreção de insulina, promover anabolismo proteico muscular e ainda melhorar o rendimento físico relacionado à fadiga central. Por estes motivos, com a finalidade de melhorar a saúde física e mental, os ACR são amplamente utilizados como suplemento, principalmente na nutrição esportiva (SHIMOMURA *et al.*, 2006; ROGERO; TIRAPEGUI, 2008; ZHANG *et al.*, 2017).

Os ACR são primordialmente metabolizados no musculo esquelético, devido a distribuição das duas primeiras enzimas que participam do seu catabolismo, aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ATACR) e complexo enzimático desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR) (ROGERO; TIRAPEGUI, 2008). Representado na **Figura 1**. Além das células musculares, os ACR também podem ser metabolizados por células imunológicas, pois estas apresentam as enzimas necessárias para sua catálise (SHIMOMURA *et al.*, 2006).

Figura 1. Representação da estrutura molecular dos aminoácidos de cadeia ramificada (ACR). Os ACR são aminoácidos essenciais, ou seja, não são produzidos por via endógena, portanto necessitam ser obtidos por meio da dieta. Após sua ingestão, os ACR são metabolizados preferencialmente no músculo esquelético. Esse tecido possui as enzimas necessárias para oxidação dos ACR, aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (ATACR) e complexo enzimático desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR). A partir de sua metabolização os ACR fornecem substrato intermediários do ciclo de Krebs, ou seja, são fonte de energia e também fornecem substrato para síntese de glutamina e alanina.

A influência dos ACR sobre a funcionalidade imunológica, iniciou-se a partir da constatação de que células imunológicas são capazes de incorporar os ACR e utilizá-los não só como fonte energética, mas também como precursores, novas células e de moléculas mediadoras inflamatórias (NEGRO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2017). Estudos mais antigos da literatura, já demonstraram resultados positivos na relação entre os ACR e o sistema imune. Em cultura de linfócitos, houve redução da proliferação celular, concomitante a diminuição da concentração dos ACR (CALDER, 2006). Paralelamente, em dieta de roedores, demonstrou-se que a redução dos ACR,

afetou a atividade de células *natural killer* (NK) (TSUKISHIRO *et al.*, 2000). Segundo TAJIRI; SHIMIZU, 2013 um estudo com humanos, a suplementação com ACR levou a diminuição da mortalidade de pacientes com sepse.

Estudos mais recentes, relacionaram os ACR com mecanismos de reparo frente ao dano causado pelo estresse oxidativo. Sabe-se que esse estresse pode levar ao dano celular, principalmente devido à instabilidade do DNA e como consequência conduzir o aparecimento de mutações genômicas e câncer (NAKANISHI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2017). Segundo D'ANTONA *et al.*, 2010, ratos que receberam dietas enriquecidas com os ACR tiveram um aumento da biogênese mitocondrial e ao mesmo tempo diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), além de aumentarem a expressão de receptores do tipo PPAR- γ e a expressão de sirtuina-1, ambos relacionados à proteção contra lesões consequentes do estresse oxidativo. Corroborando com esse resultado, LEE *et al.*, 2017, avaliou a suplementação com ACR em células Raw 264.7, e mostrou que os aminoácidos exerceram efeito protetor ao DNA perante o dano por H₂O₂.

Determinadas vias do processo inflamatório também podem ser alteradas pela deficiência dos ACR. De acordo com, JANG *et al.*, 2016, em um estudo realizado com carpas, a deficiência de leucina levou ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e diminuição de citocinas anti-inflamatórias por meio de alterações na expressão do fator de transcrição NF κ B. Em concordância, LEE *et al.*, 2017, mostrou que os ACR levaram a diminuição da citocina pró inflamatória IL6 em células Raw 264,7 estimuladas com LPS. Dessa forma alterações na suplementação com os ACR podem ser significativas para o normal funcionamento do organismo, não apenas relacionado a vias metabólicas, mas também e principalmente em processos inflamatórios.

1.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E CAPACIDADE IMUNOMODULATORIA

A primeira evidência concreta de que a medula óssea contém células precursoras não-hemopoéticas provém de estudos realizados por Friedenstein (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976). Este autor foi o pioneiro no isolamento, a partir da medula óssea, de células com características clonogênicas, fibroblastóides, com alta aptidão para replicação *in vitro* e com capacidade de diferenciação (AFANASYEV; ELSTNER; ZANDER, 2009). Posteriormente, estudos evidenciaram que essas células estromais mesenquimais multipotentes, chamadas atualmente de células tronco mesenquimais (CTMs), têm a capacidade de se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, como osteócitos, condrócitos, adipócitos (BARRY e MURPHY, 2004; KURODA *et al.*, 2010). Recentemente, foi demonstrado que estas células podem se transdiferenciar e adotar perfis de expressão e fenótipos funcionais de células neuroectodérmicas, endodérmicas e mesodérmicas viscerais (EGEA *et al.*, 2011).

Segundo o *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) existem três critérios necessários para considerar uma população celular como CTM, que se resumem em habilidade de aderência seletiva ao plástico; marcadores específicos de superfície, como por exemplo presença de CD73 e CD90 e ausência de CD45 e CD19 e por último a habilidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006).

Estudos iniciais consideravam que o efeito modulatório das CTM advinha de sua capacidade de reconstituição de tecidos danificados, que foi nomeado como *cell replacement* (reposição celular). Pesquisadores supunham que as CTM migravam para os tecidos alvo, diferenciavam-se e restituíam as células lesadas, regenerando o tecido.

Entretanto, posteriormente, mostrou-se em modelos animais com cirrose hepática e falência renal que a eficiência das CTM em repor células de tecidos lesados era praticamente nula (SAKAIDA *et al.*, 2004; TÖGEL *et al.*, 2005). A fim de elucidar o efeito modulatório das CTM, um novo mecanismo foi proposto. A partir do tratamento eficiente para doenças inflamatórias, utilizando o sobrenadante de culturas celulares das CTM, concluiu-se que essas células são capazes de regular a inflamação e a homeostasia de tecidos por meio da síntese de uma variedade de substâncias, como citocinas e fatores de crescimento, que foi nomeado como *cell empowerment* (fortalecimento), representado pela **Figura 2** (JIANG; XU, 2020). A descoberta das CTM e principalmente o melhor entendimento de sua capacidade imunomodulatória simbolizou uma enorme inovação na terapia celular para doenças inflamatórias (WANG *et al.*, 2014).

Figura 2. Efeito modulatório das CTM por meio da síntese de mediadores solúveis. Após lesão tecidual e início do processo inflamatório local, as CTM são atraídas para a região da injúria. Essas células então diferenciam-se em células funcionais em resposta a citocinas inflamatórias e iniciam-se sua atividade secretória. Além de mediadores regulatórios da inflamação, as CTM também sintetizam fatores de crescimento, que irão estimular atividade de fibroblastos e células endoteliais. Todos esses fatores em conjunto estimulam reparo tecidual e modulam de forma ativa o microambiente, principalmente de maneira imunoregulatória. Adaptado de WANG *et al.*, 2014.

As CTMs podem influenciar tanto o sistema imune inato, quanto o sistema imune adaptativo (WANG *et al.*, 2014). A plasticidade imunológica das CTMs relaciona-se diretamente com o tipo de estímulo inflamatório proveniente do microambiente onde se encontram (WANG *et al.*, 2012; JIANG; XU, 2020), podendo adquirir perfil imunossupressor ou pró-inflamatório. As CTMs adquirem perfil pró-inflamatório quando expostas a produtos microbianos, como por exemplo, lipopolissacarídeo (LPS) ou peptídeoglicano (PGN). Já o perfil imunossupressor é adquirido quando estas células recebem estímulo inicial por citocinas como TNF- α ou INF- γ conforme representado na **Figura 3**.

As propriedades imunomodulatórias das CTM, desenvolvidas a partir dos estímulos como TNF- α ou INF- γ já foram bastante exploradas e demonstrou-se que essas células podem desenvolver um importante perfil imunossupressor, inibindo células dendríticas, macrófagos e linfócitos T, mas ao mesmo tempo, as CTM podem estimular a geração de linfócitos T reguladores (Treg). Por meio de mecanismos ainda não elucidados, as CTM podem atuar inibindo tanto a proliferação de linfócitos T, como também a diferenciação para Th1 e Th17. Em células dendríticas, observou-se desenvolvimento de perfil tolerogênico, já nos macrófagos houve aumento do fenótipo anti-inflamatório (M2) (LUZ-CRAWFORD *et al.*, 2013).

O desenvolvimento do fenótipo pró-inflamatório das CTM, a partir de um estímulo microbiano (LPS ou PGN), reflete na liberação de diversos mediadores inflamatórios como por exemplo as citocinas IL-1, IL-8, MIF, GM-CSF que promove aumento da migração de neutrófilos para os sítios de inflamação, além de CCL2, CCL3 CCL12 que recrutam monócitos para o local do dano, além de estimular a diferenciação em macrófagos pró-inflamatórios M1 (ULIVI V. *et al.*, 2014). Já o fenótipo

anti-inflamatório das CTMs, desenvolvido pela ligação a citocinas pró-inflamatórias, resulta na liberação de mediadores que atuarão inibindo a funcionalidade e proliferação de células imunes, como por exemplo prostaglandina E2, NO, IDO, IL-10 e HGF (MEISEL *et al.*, 2011).

Figura 3. Plasticidade imunológica das CTMs de acordo com o ambiente em que estão inseridas. De acordo com o estímulo inicial que recebem, as células tronco mesenquimais podem adquirir perfil imunossupressor ou pró-inflamatório. Como ilustrado na parte esquerda da figura 2, após estímulo com citocinas $TNF-\alpha$ e/ou $IFN-\gamma$, as CTM desenvolverão perfil imunossupressor. Nessa situação haverá síntese de mediadores solúveis regulatórios que terão capacidade de inibir tanto diferenciação quanto perfil efetor e sintetizador de diversas células imunológicas. Já delineado na parte direita da figura 2, ao receber estímulos como LPS ou PGN, as CTM desenvolvem perfil pró-inflamatório, sintetizando diversas citocinas que irão estimular produção de mediadores e perfis celulares de atividade inflamatória, como no exemplo da figura acima, o perfil M1 de macrófagos. Adaptado de (HUMPHREYS; BONVENTRE, 2008; LE BLANC; DAVIES, 2015).

Devido as propriedades imunomodulatórias citadas, as CTMs já foram utilizadas para tratamento de algumas doenças (MARTIN *et al.*, 2019). Segundo WANG *et al.*, 2014 foi realizada, em um paciente de 9 anos de idade portador de doença grave, a primeira aplicação clínica bem-sucedida utilizando as CTMs. A partir

deste momento, diversos estudos clínicos e com animais mostraram a enorme capacidade das CTMs em melhorar o quadro de pacientes com doenças debilitantes. Em humanos podemos ainda citar o benefício da terapia com CTM em pacientes portadores de doenças hepáticas, cardiovasculares e ainda autoimunes (GLENN, 2014). Pode-se concluir, portanto, que terapias celulares utilizando as CTMs apresentam influência positiva na modulação do sistema imune, consequentemente prevenindo desequilíbrio do processo inflamatório e evitando potenciais danos teciduais. Dessa forma, com objetivo de minimizar os desafios pertinentes ao uso das CTMs, tornam-se válidas as pesquisas para melhor investigação das mesmas.

1.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO e TRANSDUÇÃO DE SINAL

Por meio da função coordenada e conjunta de órgãos e tecidos, a homeostasia pode ser alcançada. Para tanto, destaca-se a comunicação celular, a qual é realizada por meio da emissão tanto de sinais extra, quanto intracelulares. A sinalização celular determina de que maneira, e quando uma célula deve agir. Para tanto, há ligação, por meio de um receptor, de uma molécula ou célula sinalizadora ao seu alvo. Isso levará a transdução de um sinal que terá como objetivo estabelecer o comportamento celular. Esse mecanismo pode ter influência sobre uma variedade de efeitos biológicos, como por exemplo proliferação, viabilidade celular e até mesmo expressão de genes (HALL, JOHN EDWARD; GUYTON, 2017)

O controle da proliferação e da progressão adequada do ciclo celular ao longo das fases G1-S-G2-M, são importantes para manutenção celular (HALL, JOHN EDWARD; GUYTON, 2017). Diversas proteínas-chave atuam nesse evento e foram destacadas nesse trabalho a PCNA e c-Myc. A proteína PCNA, inicialmente era

conhecida por participar da proliferação celular, uma vez que é requerida pela enzima DNA polimerase. Sabe-se nos dias atuais, que a PCNA pode atuar em vários eventos como remodelação de cromatina, reparo de DNA e ainda e principalmente no controle do ciclo celular, já que atua na estabilização, recrutamento e troca de proteínas de replicação. A proteína c-Myc também participa ativamente do ciclo celular, da síntese proteica e apoptose (HOFFMAN; LIEBERMANN, 2008). As interações celulares e moleculares existentes nos compartimentos teciduais e intersticiais são fundamentais para o equilíbrio ciclo celular. Dessa forma, mantendo a capacidade proliferativa das células e ao mesmo tempo evitando que as divisões celulares aconteçam de maneira desequilibrada.

Como mencionado anteriormente, a presença de receptores, é essencial ao evento de sinalização celular. Existem inúmeros tipos de receptores em células do sistema imune, como os receptores do tipo Toll Like (TLR). Estes, são uma família de receptores que participam do reconhecimento de padrões e desempenham um papel importante no reconhecimento imune inato. Os TLR podem estar presentes em uma grande variedade de células, incluindo as CTMs. Essas células podem expressar TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9 (JIANG W, XU J, 2019), e uma vez que esse receptor esteja ativado, as CTM podem responder de maneira tanto pró, quanto anti-inflamatória.

Um dos mais potentes estímulos microbianos para respostas inatas que se ligam ao TLR é o lipopolissacarídeo (LPS) (LIU *et al*, 2004). O lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente em bactérias Gram-negativas, capaz de ser reconhecido pelo receptor TLR do tipo 4 (TLR4). A sinalização consequente da ligação do LPS ao TLR4, culmina na ativação de proteínas capazes de migrarem ao núcleo celular e ligarem-se a sequências específicas do DNA, dessa forma coordenando a

transcrição e modulando a expressão de determinados genes (VANDENABEELE *et al.* 2010; GUPTA *et al.*, 2010., LIMA *et al.*, 2013).

Detalhadamente, o LPS liga-se a proteína de diferenciação mielóide 2 (MD2), formando um complexo que consegue se unir ao TLR4. Após, há acoplamento da proteína CD14, também necessária para que ocorra a sinalização eficiente do TLR4. A partir dessa ligação há início da cascata inflamatória e a transdução de sinais. (LIU *et al.*, 2004). Uma vez ativado o complexo TLR-4, algumas vias de sinalização importantes para resposta imune podem ser desencadeadas como STAT (*signal transducer and activator of transcription*) e também do fator de transcrição NFκB (GHOSH; DASS, 2016).

O NFκB é um fator de transcrição inerente ao processo inflamatório, e apesar de também participar do desenvolvimento de linfócitos e da patogênese de cânceres, seu papel mais bem conhecido e estudado se dá na resposta imunológica, na qual regula expressão de genes essenciais na inflamação, bem como na sobrevivência, proliferação e apoptose (GILMORE e GARBATI, 2011; ZHENG *et al.*, 2011).

Em células não estimuladas, o fator de transcrição NFκB, encontra-se no citoplasma na sua forma inativa, e devido a sua associação com proteínas denominadas inibidoras κB (IκB) (CAAMANO; HUNTER, 2002; LI; VERMA, 2002), este complexo impede a migração do NFκB para o núcleo. Diversos estímulos podem levar a ativação do NFκB como neurotrofinas, proteínas neurotóxicas (como a β-amilóide), citocinas (interleucina-1 e fator de necrose tumoral), glicocorticóides, ésteres de forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, irradiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível e a ciclooxigenase tipo 2 (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997). Uma vez ativado o IκB, do complexo NFκB/IκB é fosforilado no resíduo de

serina pelo complexo de proteína quinase IKK. Essa fosforilação é o sinal para separação do complexo NFκB/IκB e para a ubiquitinação e posterior degradação do IκB pelo proteassoma 26S. Após a degradação do IκB os dímeros do NFκB são liberados para migrarem para o núcleo onde exercerão sua função sobre a regulação da transcrição de genes específicos. (KALTSCHMIDT; WIDERA; KALTSCHMIDT, 2005; GHOSH; DASS, 2016).

A ativação da via do NFκB leva a produção de mediadores inflamatórios como por exemplo as citocinas IL1, GM-CSF, IL10 e TGFβ, esses mediadores controlam a infecção por meio da liberação de mediadores secundários, indução da quimiotaxia e da ativação, sobrevivência, proliferação, maturação e/ou morte de células imunológicas (GILMORE e GARBATI, 2011; DA SILVA LIMA *et al.*, 2013).

Muitos mediadores secundários são produzidos durante o processo inflamatório, principalmente induzidos pelas citocinas, como por exemplo o óxido nítrico (NO) e a prostaglandina E2 (PGE₂). O NO é capaz de ser sintetizado por quase todos os tipos celulares utilizando a arginina como precursor. Suas funções vão desde vasodilatação até inibição da agregação plaquetária e da adesão de leucócitos ao endotélio vascular (Davis KL, 2001). Já a PGE₂ tem a origem de sua síntese estimulada nas membranas plasmáticas, tanto de procedência fisiológica, quanto patológica. Muitos trabalhos na literatura destacam o papel imunossupressor da PGE₂ como potencial inibidora da proliferação de linfócitos T e ainda como influenciadora para diferenciação de linfócitos Treg (BETZ, M., FOX, 1991).

Além de exercerem as funções já mencionadas, algumas citocinas ainda se ligam a família de receptores dos tipos I e II, que envolvem transdução de sinais por tirosinoquinas, denominadas de Janus quinases (JAKs) e ainda o fator de transcrição STAT (transdutores de sinais e ativadores de transcrição). A ativação da

via do JAK/STAT além de promover a transcrição de genes relacionados a inflamação, também favorece a proliferação, diferenciação e apoptose celular (VILLARINO *et al*, 2015).

A via do JAK/STAT inicia-se com a ligação da citocina ao receptor provoca a sua dimerização, o que leva à junção das duas janus kinases (JAKs), possibilitando a fosforilação da extremidade do receptor, assim como o recrutamento das proteínas monoméricas STAT. Dessa forma as proteínas STAT são fosforiladas, como consequência um monômero STAT consegue ligar-se a uma STAT adjacente. Os dímeros STAT formados migram para o núcleo, onde iniciam a transcrição de genes relacionados a inflamação (VILLARINO *et al*, 2015).

Os estímulos que levam a ativação do NFkB, culminam com a transcrição e expressão de genes relacionados a inflamação, especialmente as citocinas. Esses mediadores inflamatórios apresentam função de alarmar o sistema imune por meio da comunicação celular e ativação de alguns receptores (ABBAS, AK LICHTMAN AH, 2018). Essa propagação de sinal leva ativação de outras vias de transcrição como a do JAK/STAT aumentando dessa forma a magnitude da resposta imune e do processo inflamatório.

Entretanto, o aumento agudo e progressivo da resposta inflamatória pode gerar graves consequências sistêmicas e até mesmo patológicas, envolvidas no desenvolvimento de diversas doenças. Os mecanismos imunes necessitam de árduo controle regulatório, inibindo ativação de células e também a síntese de mediadores químicos, para evitar desta forma que os tecidos sejam lesados. Dentro desse contexto, torna-se importante o maior conhecimento sobre a modulação do sistema imune (AKAMINE *et al*, 1994).

2. OBJETIVO

Sabe-se que as CTMs são células que possuem capacidade imunoregulatória e que os ACR apresentem ações importantes na modulação da funcionalidade de células do sistema imune. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo estudar a influência dos ACR em modular alguns aspectos imunoregulatórios da CTMs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células da linhagem C₃H₁₀T_{1/2} e grupos experimentais

Foram utilizadas células tronco mesenquimais da linhagem C₃H₁₀T_{1/2}, essas células foram obtidas da American Type Culture Collection (Clone 8, ATCC® CCL-226™; Rockville, Maryland, EUA) e mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), baixa glicose (Vitrocell, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Vitrocell), penicilina / estreptomicina a 1% (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Sigma). As células C₃H₁₀T_{1/2} foram incubadas e mantidas a 37 ° C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Para avaliar os efeitos dos ACR nas CTM, essas células foram expostas a esses aminoácidos por 24 horas de acordo com os seguintes grupos experimentais. Valendo-se do fato de que a literatura já mostrou que a ausência dos ACR em meios de cultura pode levar a inibição da síntese proteica e da proliferação celular, utilizamos o meio DMEM, que contém naturalmente em sua composição 0,8 mmol / L de valina, isoleucina e leucina, como nosso grupo controle. Utilizamos os grupos isoleucina, valina e leucina com concentração final de 2 mmol / L de cada aminoácido respectivamente e utilizamos o grupo BCAA com concentração final de 2mmol/L dos três aminoácidos concomitantemente, conforme representado na **Figura 4**. A concentração final de 2 mmol / L foi selecionada, pois dados da literatura já mostraram que concentrações mais altas dos ACR podem promover aumento do estresse oxidativo, aumento de efeitos inflamatórios e, conseqüentemente, morte celular. Ainda, estudos similares verificaram efeitos significantes com a concentração de 2mmol/L de outros aminoácidos, como por exemplo a glutamina.

Figura 4. Delinhamento dos grupos experimentais de acordo com as concentrações finais de ACR.

As células foram estimuladas com 1,25 µg / mL do lipopolissacarídeo (LPS - componente de revestimento bacteriano de bactérias Gram-negativas, Sigma, 055: B5). O LPS promove forte resposta imune, ativando fatores de transcrição relacionados ao processo inflamatório e consequentemente síntese de citocinas. A concentração de 1,25µg/mL foi escolhida com baseada em trabalhos anteriores do nosso grupo, que mostraram que essa concentração é capaz de ativar e amplificar a resposta inflamatória sem prejudicar a viabilidade celular. O LPS foi utilizado por 24 horas concomitantes à suplementação com ACR, nos ensaios de MTT, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), ciclo celular, óxido nítrico (NO) e citocinas e

por 30 minutos para verificar o conteúdo proteico de alguns fatores de transcrição no ensaio de Western blotting.

3.2 Ciclo celular após suplementação com aminoácidos

Após o período de cultura celular, 1×10^6 células foram removidas da garrafa de cultura com 0.25% trypsin (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brazil), e o conteúdo foi transferido para o tubo. Após o tubo foi centrifugado por 7 minutos em 252 g, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o pellet celular foi ressuspensionado em 4 mg/mL de ribonuclease A (USBiological, Massachusetts, USA, #R2011) e 200 μ l of 0.1% triton x-100 + 0.1% citrate. Então, o tubo foi incubado em banho Maria a 37 ° C por 30 minutos; nos últimos 5 minutos de incubação foi adicionado 5 μ l of PI (PI; Becton & Dickinson, #BD 556463). Para aquisição dos dados, utilizamos o citômetro de fluxo FACSCanto II, e a análise das células foi realizada no FlowJo 7.6® software (Tree Star). A progressão do ciclo celular foi analisada pela quantificação do percentual de células nas regiões correspondentes as fases G1/G0 e S/G2/M do ciclo.

3.3 Atividade metabólica por MTT

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

Após 24 horas de exposição das CTMs aos diferentes grupos de ACR, 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 100µL 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 Conteúdo proteico de PCNA, PGC1-α, c Myc, PPARγ, NFκB, e STAT-3

A avaliação do conteúdo proteico de PCNA, PGC1-α, c Myc, PPARγ, NFκB e STAT-3 nas células C3H10T1 / 2 foi realizada pela técnica de Western blotting. Inicialmente realizou-se o prepro do gel de poliacrilamida, procedeu-se 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.

Após foram preparados os lisados de proteínas para SDS-PAGE. 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 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 100 µg/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 µg 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 µg de proteína).

Em seguida foi realizada a transferência das proteínas para a membrana de nitrocellulose. 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 nitrocellulose 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. Procedeu-se 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 %).

A seguir, as proteínas da membrana de nitrocellulose foram sondadas com anticorpos, como descrito a seguir. Inicialmente, os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico, a 3 %, em tampão TBS, por 0,5-14 h, sob agitação. O anticorpo específico foi diluído (1:1000 para NF-κB fosforilado e total, c-Myc total e fosforilado e PPAR-γ fosforilado e total, 1:5000 para PCNA e para PGC1-α, e 4:1000 para STAT 3 fosforilado e total) em TBS com 0,05% Tween 20 (TBST) e utilizado para a incubação com as membranas, por

2-14 h, com agitação, à temperatura ambiente. 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.

Por ultimo as proteínas marcadas com os anticorpos específicos foram reveladas pelo sistema de quimioluminescencia. A revelação foi realizada utilizando-se o Kit ECL Plus (luminol, fenol e peróxido de hidrogênio), para análise foi utilizado o digitalizador de Imagem ImageQuant 400 (GE Helthcare).

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações de Western Blotting

Anticorpo	Fabricante	Referência
Anti cMyc	Santa Cruz	SC-788
Anti p-cMyc	Santa Cruz	SC-8000R
Anti NFkB	Santa Cruz	SC-372
Anti p-NFkB	Santa Cruz	SC-33039
Anti STAT 3	Santa Cruz	SC-482
Anti p-STAT 3	Santa Cruz	SC-8001-R
Anti PPAR _γ	Santa Cruz	SC-7196
Anti p-PPAR _γ	Santa Cruz	SC-280001-R
Anti PCNA	Santa Cruz	SC-56
Anti PGC1-α	Biorbyt	ORB13647

3.5 Dosagens de citocinas e PGE₂ pelas CTM

As células C3H10T1/2 foram mantidas em cultura a 37 °C, 5% de CO₂, em placas de cultura com 24 poços na concentração de 1x10⁶ células por poço, e um volume total de 1 mL. As células foram cultivadas de acordo com os grupos descritos no item 3.1, estimuladas com LPS. Após 24 horas, o sobrenadante da cultura celular foi removido e congelado (-80 °C) para posterior dosagem. A determinação da concentração de IL1-β, GM-CSF, IL10 e TGFβ presente no sobrenadante das culturas celulares foi realizada pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) – kits R&D Systems. Para PGE₂ utilizou-se o kit (Cayman Chemical, Michigan, USA).

3.6 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Para a quantificação do NO• no sobrenadante das CTM, foi utilizada uma 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” NOAnalysisTM e os resultados foram fornecidos em μM de nitrito/nitrato. A

sensibilidade do NOA para a medida do NO• em fase gasosa é de aproximadamente 1 picomol.

3.7 Cultura com sobrenadante de CTM em células Raw 264.7

Nessa etapa, foram utilizados macrófagos da linhagem Raw 264.7 (mouse leukaemic monocyte macrophage cell line). Essas células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM) (Cultilab®, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Cultilab®, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 2mM de GLUT (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). 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 Raw foram tripsinizadas e plaqueadas com sobrenadantes de CTMs, previamente cultivadas de acordo com o item 3.1. Conforme representado na **Figura 5**.

Figura 5. Delineamento dos grupos experimentais para ensaios com cultura de sobrenadante das CTM previamente tratadas com os ACR em macrófagos da linhagem Raw 264.7.

3.7.1 Avaliação da atividade metabólica por MTT

Inicialmente as células Raw 264.7 foram cultivadas em meio de cultura DMEM, até atingirem confluência necessária para serem plaqueadas. Após esse período foram tripsinizadas e plaqueadas em placa de 96 poços, na concentração de 5×10^5 células/mL de sobrenadantes de CTMs, previamente cultivadas de acordo com item 3.1, por 24 horas. Após esse período realizou-se o ensaio de MTT de acordo com o já descrito anteriormente.

3.7.2 Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo

As células Raw 264.7 foram cultivadas em meio de cultura DMEM, até atingirem confluência necessária para serem plaqueadas. Após esse período foram

tripsinizadas e plaqueadas em placa de 24 poços, na concentração de 5×10^5 células/mL de sobrenadantes de CTMs por 24 horas, previamente cultivadas de acordo com item 3.1. Após esse período avaliou-se a morte por apoptose e necrose por citometria de fluxo como já descrito anteriormente.

3.7.3 Dosagem de citocinas

As células Raw 264.7 foram cultivadas em meio de cultura DMEM, até atingirem confluência necessária para serem plaqueadas. Após esse período foram tripsinizadas e plaqueadas em placa de 24 poços, na concentração de 1×10^6 células/mL de sobrenadantes de CTMs por 24 horas, previamente cultivadas de acordo com item 3.1. Após esse período avaliou-se a síntese das citocinas IL-6, IL-10 E TNF- α por citometria de fluxo como já descrito anteriormente.

3.8 Cultura com sobrenadante de CTM em células linfócitos

Para os ensaios com cultura de sobrenadante das CTM em linfócitos, células utilizamos o baço de camundongos Swiss 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 / FCFUSP 556). Os baços foram removidos e dissociados suavemente usando agulhas e pinças em placas de Petri contendo 10 mL de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (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

semeadas em um fundo de placa de 12 poços a uma densidade de 1×10^6 células por mL; cultivadas em meio condicionado, de acordo com os grupos descritos acima; e estimulado com $1,25 \mu\text{g} / \text{mL}$ de LPS por 3 dias. As células foram mantidas a 37°C , 5% de CO_2 e em atmosfera umidificada. Conforme representado na **Figura 6**.

Figura 6. Delineamento dos grupos experimentais para ensaios com cultura com sobrenadante condicionado das CTMs previamente tratadas com os ACR em linfócitos.

3.8.1 Dosagem de citocinas

Os linfócitos foram cultivadas nos sobrenadantes condicionados, conforme descrito no item 4.9. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi retirado e avaliou-se a síntese das citocinas IL-4, IL-10 e INF- γ pelo método de ELISA como já descrito no item 3.5.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (MEV) de três a seis experimentos independentes. As diferenças estatísticas entre o controle e os diferentes grupos de tratamento foram determinadas pela ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Dunnett. Para todas as análises estatísticas, o nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Influencia dos diferentes ACR na atividade metabólica.

De acordo com os dados já descritos na literatura a respeito dos ACRs serem fornecedores de substrato para vias metabólicas, iniciamos nossos experimentos, com o ensaio de MTT. Por meio do qual, entenderíamos melhor o comportamento das CTM perante a suplementação com os ACRs em relação a mitocôndrias viáveis e metabolicamente funcionais. Os resultados mostraram que, em relação ao controle, os grupos suplementados com aminoácidos, tanto de maneira isolada (isoleucine, leucine e valina), quanto os três aminoácidos concomitantemente (grupo BCAA), levaram ao aumento da atividade metabólica celular. Também observamos que os grupos BCAA e leucine apresentaram atividade metabólica significativamente maior quando comparado aos grupos suplementados apenas com isoleucina e valina. Representado na **Figura 7**.

Figura 7. Atividade metabólica celular após suplementação com aminoácidos. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão SEM ($n = 6$). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs control; & $p < 0.05$ vs BCAA.

4.2 Influencia dos diferentes ACR no ciclo celular das CTM.

Para analisar a influência das diferentes suplementações com os ACR na progressão do ciclo celular das CTM, as porcentagens de células nas fases do ciclo celular G0 / G1 e S / G2 / M foram quantificadas por citometria de fluxo. Em relação ao controle, nosso grupo BCAA mostrou uma porcentagem menor de células na fase do ciclo celular G0 / G1 e uma porcentagem maior de células na fase S / G2 / M, indicando que houve um aumento na proliferação celular quando as células são cultivadas com maiores quantidades de BCAA. Ainda observamos que os grupos isoleucine e leucine, apresentaram maior percentual de células em fase S/G2/M do ciclo quando comparados ao grupo valina. **Figura 8.**

Figura 8. Ciclo celular as CTMs com diferentes suplementações dos aminoácidos. Os resultados foram expressos em media $\pm$ desvio padrão $\pm$ SEM (n = 6). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por **p<0.01, and ***p<0.001 vs control; &p<0.05, &&p<0.01, and &&&p<0.001 vs BCAA.

4.3 Influencia dos ACR no conteúdo proteico de PNCA e c-Myc expression nas CTMs.

Os resultados da progressão do ciclo celular foram confirmados por meio da análise do conteúdo proteico do antígeno nuclear em proliferação celular (PCNA) (Fig. 9 A), o principal regulador da entrada do ciclo celular e o metabolismo proliferativo, e o c-Myc (Fig. 9B) Para o PCNA, pudemos observar que os grupos valina, leucine e BCAA apresentaram aumento do conteúdo proteico para PCNS quando comparados ao grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças na comparação da isoleucina com o grupo controle ou na comparação dos diferentes aminoácidos estudados (Fig. 9A). Já para a razão entre c-Myc fosforilado e total também observamos aumento significativo para os grupos suplementados com valina e no grupo BCAA quando comparado ao grupo controle (Fig. 9B), mas não foram observadas diferenças estatísticas nos grupos leucine e isoleucine quando comparadas ao grupo controle (Fig. 9B).

Figura 9. Influência das diferentes suplementações com aminoácidos no conteúdo proteico da PCNA (Fig. 9A) e na razão p c-Myc/c-Myc (Fig 9.B). Resultados de quarto experimentos independentes para análise de western blots. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (n = 4). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs controle.

4.4 A influência dos diferentes aminoácidos sobre o conteúdo proteico de NFκB, STAT-3, PPAR-γ, e PGC1-α nas CTM.

De acordo com os resultados até então obtidos, nosso próximo passo foi avaliar a participação e influência dos ACRs sobre proteínas participantes de vias do processo inflamatório. Dessa forma, avaliamos inicialmente o conteúdo proteico da razão da proteína fosforilada/total de NFκB e PPAR-γ (Figuras 10 A e B). Para o NFκB (Fig. 10A) observamos redução no conteúdo proteico nos grupos valina, leucina e BCAA quando comparamos ao grupo controle. Já para o PPAR-γ (Fig. 10B) foi possível observar aumento do conteúdo proteico para os grupos valina e BCAA também quando comparados ao grupo controle.

Figura 10 (A e B). Influência das diferentes suplementações com aminoácidos na razão do conteúdo proteico de pNFκB/NFκB e p-PPAR γ/PPARγ de CTMs estimuladas com LPS. Resultados de quarto experimentos independentes para análise de Western blotting. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (n = 4). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por: **p<0.01 vs control.

Ainda dentro da análise de proteínas de vias de processos inflamatórios, nos também avaliamos a razão da proteínas fosforilada/ total do STAT 3 (Fig. 10 C). Para essa proteína encontramos aumento do conteúdo proteico no grupo BCAA quando comparamos ao nosso grupo controle. Avaliamos também o conteúdo proteico de PGC1- α (Fig 10 D), entretanto de acordo com as condições propostas por nós nesse trabalho, não foi possível observar diferença significativa entre nossos grupos tratados com os ACR.

Figura 10 (C e D). Influência das diferentes suplementações com aminoácidos na razão do conteúdo proteico p-STAT-3/STAT-3 e PGC-1 α de CTMs estimuladas com LPS. Resultados de quarto experimentos independentes para análise de Western blotting. Os resultados foram expressos em media $\pm$ desvio padrão (n = 4). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por: **p<0.01 vs control.

4.5 A influência dos diferentes ACR na síntese de mediadores solúveis pelas CTM.

Para complementar nossos resultados a respeito da influência dos ACR no processo inflamatório, avaliamos a síntese de alguns mediadores solúveis sintetizados pelas CTMs após 24 horas de exposição aos aminoácidos (Figuras 11 A, B , C e D). Avaliamos a citocina IL-10 e de acordo com nossas condições de trabalho, não encontramos diferença significativa para sua síntese em nosso grupos tratados. Avaliamos também a citocina TGF- β e observamos aumento significativo de sua síntese nos grupos isoleucine, valina, leucine e BCAA quando comparados ao grupo controle.

Avaliamos também o mediador inflamatório PGE₂, observamos no grupo valina um aumento significativo da síntese de PGE₂ quando comparado ao grupo controle. Ainda avaliamos a síntese de NO, entretanto não observamos diferenças estatísticas entre nossos grupos tratados com os aminoácidos.

Figura 11. Influência das diferentes suplementações com aminoácidos na produção de IL-10 (Fig 11 A), TGF-β (Fig 11B), PGE₂ (Fig. 11C) e NO (Fig 11D) em CTMs estimuladas com LPS. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão (n = 4). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por: *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001 vs control. #p<0.05 vs leucine.

4.6 Viabilidade e atividade metabólica de macrófagos da linhagem Raw 264.7 cultivados com sobrenadante de CTMs previamente tratadas com ACRs.

De acordo com a literatura, as CTMs têm uma grande capacidade imunomoduladora e podem influenciar o microambiente em que se encontram, principalmente pela secreção de mediadores solúveis, estimulando a ativação ou inativação de alguns tipos de células. Nesse contexto, estudamos a influência do sobrenadante da CTM em alguns aspectos da resposta inflamatória dos macrófagos. Os resultados do ensaio MTT não mostraram diferenças ao comparar os diferentes meios condicionados (Fig. 12A). A única diferença observada foi ao comparar o controle de meio condicionado com DMEM (controle negativo). Em relação à

viabilidade celular, observamos que nenhum dos tratamentos empregados afetou a viabilidade dos macrófagos (Fig. 12 B).

Figura 12. Influência do meio condicionado de CTMS previamente cultivadas com diferentes aminoácidos em, atividade metabólica e viabilidade de macrófagos da linhagem Raw 264.7. Atividade metabólica avaliada por MTT e viabilidade celular. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n = 4$). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por $\delta\delta p < 0.01$ quando comparados ao controle condicionado (Ctl. Cond. vs DMEM)

4.7 Síntese de citocinas por macrófagos da linhagem Raw 264.7 cultivadas com sobrenadante de CTMs previamente tratadas com os aminoácidos.

Por meio do processo inflamatório, o sistema imunológico é considerado um auxiliar fundamental para manutenção da homeostase. Vários fatores solúveis

participam da resposta inflamatória tanto para mantê-la e amplificá-la, mas também para regulá-la. Para detalhar ainda mais a relevância da influência da suplementação de ACRs na produção de citocinas, elas foram dosadas em macrófagos da linhagem Raw 264.7 após ser cultivada com meio condicionado.

Primeiro, verificou-se a atividade do meio condicionado (comparando células cultivadas em DMEN e células cultivadas em meios condicionados controle). Os resultados mostraram que os meios condicionados foram capazes de reduzir a produção de IL-6 e TNF- α nos macrófagos, além de aumentar a produção de IL-10 de acordo com os resultados da literatura.

No entanto, a principal idéia deste estudo foi provar que as CTMs cultivadas com diferentes ACR poderiam afetar o potencial imunorregulador das CTMs. Dessa forma, os resultados mostraram que os meios condicionados das CTMs cultivadas com isoleucina têm capacidade para reduzir ainda mais a produção de IL-6 em comparação com um meio condicionado controle ou mesmo em comparação com valina, leucina ou meio condicionado BCAA (Fig. 13 A). Além disso, todos os meios condicionados das CTMs tratadas com diferentes ACR foram capazes de reduzir a produção de TNF- α por macrófagos de maneira significativa. Destacando-se, nesse contexto, a valina que mostrou maior capacidade de reduzir a produção de TNF- α dos macrófagos, seguida por leucina, BCAA e isoleucina (Fig. 13 B). Em relação à produção de IL-10 por macrófagos (Fig. 13C), não foram observadas diferenças entre os grupos.

Figura 13. Influência do meio condicionado das CTM na produção de IL6, TNF- α e IL-10 por macrófagos da linhagem Raw 264.7. Os resultados foram expressos em media $\pm$ desvio padrão (n = 4). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por: δ $p < 0.05$, $\delta\delta$ $p < 0.01$, and $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$ quando comparado ao controle condicionado vs DMEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs control. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, e ### $p < 0.001$ vs isoleucina. & $p < 0.05$ vs BCAA.

4.8 Síntese de citocinas por linfócitos cultivadas com sobrenadante de CTMs previamente tratadas com os aminoácidos.

Ainda, de maneira a melhor entender a influência dos ACR perante as características imunoregulatórias das CTMs, avaliamos a síntese de citocinas por linfócitos cultivados também com o sobrenadante das CTMs previamente tratados com os ACRs. Muitos dados da literature já descreveram a influência direta dos ACR em linfócitos, na proliferação, diferenciação e atividade de NK e CD8, entretanto, de acordo com as condições propostas por nós nesse trabalho, não foi possível

encontrar diferenças estatisticamente significativas entre nossos grupos tratados com os ACR (Figura 14 A, B e C).

Figura 14. Influência do meio condicionado das CTMs na produção de IL4, IFN- γ e IL-10 pelos linfócitos. Os resultados foram expressos em media $\pm$ desvio padrão ($n = 4$). As diferenças significativas entre os grupos tratados estão ilustradas por: $\delta p < 0.05$, quando comparado ao controle condicionado.

5. DISCUSSÃO

Os seres vivos possuem capacidade de manterem seu meio interno em condições fisiológicas constantes, atributo conhecido como homeostasia. Essa característica é inerente a sobrevivência, uma vez que agressões externas e até mesmo internas ocorram perenemente. Todos os sistemas do organismo trabalham de maneira conjunta, para manter essa constante, destacando-se, o sistema imune (HALL, J.E AND GUYTON, A.C, 2017). O sistema imune, por intermédio do processo inflamatório, é considerado um auxiliar fundamental na manutenção da homeostasia (REYES-SILVEYRA; MIKLER, 2016; ABBAS, AK LICHTMAN AH, 2018).

A resposta inflamatória quando localizada, apresenta vantagens ao organismo e envolve a eliminação da infecção acompanhada de reparo tissular (ABBAS, AK LICHTMAN AH, 2018). Entretanto, uma vez que a inflamação não seja adequadamente controlada, ela pode originar efeitos deletérios e se tornar causa de injúria e doença, incluindo as doenças inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2020). Por este motivo, pesquisadores dedicaram seus esforços para alcançar um mecanismo que reestabeleça o equilíbrio da resposta imune e minimize as consequências nocivas resultantes do processo inflamatório (AKAMINE *et al.*, 1994).

O uso de nutrientes específicos, suplementados acima dos valores fisiológicos, é aplicado há muito tempo com intuito de modular o sistema imunológico (GRIMBLE, 2001; RAITEN *et al.*, 2015; MU *et al.*, 2018;). Entre vários aminoácidos, os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) que incluem valina, leucina e isoleucina, estão correlacionados com processos metabólicos e modulação imunológica,

especialmente em linfócitos, bem como neutrófilos e eosinófilos (SCHAFER; SCHAUDER, 1988; LYNCH, 2014). Nesse contexto, as células tronco mesenquimais (CTMs) também participam da modulação imune, e são capazes de secretar vários mediadores solúveis, ativando ou inativando certos tipos de células e, dessa forma, atuam no perfil imunossupressor ou pró-inflamatório (LEYENDECKER JR. *et al.*, 2018 JIANG; XU, 2020). No entanto, não está claro como os ACR pode modular as CTMs e, embora já sejam comprovados como influenciadores imunológicos de outros tipos celulares, não há estudos na literatura focados em vias inflamatórias mais específicas, como as analisadas no presente trabalho e os meios específicos em que os ACR regulam aspectos imunomoduladores das CTMs requer mais elucidação.

Inicialmente, testamos os efeitos dos ACR nas CTMs, avaliando a proliferação e progressão do ciclo. Os ACR certamente apresentam componentes essenciais na regulação do balanço proteico, tanto na degradação quanto na síntese. Os ACR são seguramente classificados como elementos inerentes a regulação do equilíbrio proteico, tanto na degradação quanto na sua síntese (CRUZAT; KRAUSE; NEWSHOLME, 2014). Segundo ROGERO; TIRAPEGUI, 2008, os ACR são capazes de amenizar a perda de massa magra, restaurar o equilíbrio proteico muscular em idosos e ainda favorecer o processo de cicatrização. Seguindo a mesma linha, CHUANG; YU; WANG, 1990, demonstraram que a supressão de ACRs do meio de cultura de linfócitos, devido a incapacidade para síntese proteica, inibiu a proliferação destas células em respostas a fitohematoglutina. Em nosso trabalho demonstramos que preferencialmente o grupo BCAA, que recebeu suplementação concomitante com os três aminoácidos, apresentou diminuição da porcentagem de células na fase G0 / G1 e aumento da porcentagem de células em S / G2 / M, influenciando positivamente a proliferação celular.

De acordo com a literatura os ACR apresentam abundantes propriedades relacionadas a regulação de processos anabólicos: como notáveis fonte de energia, uma vez que os produtos finais do catabolismo dos ACRs participem do ciclo do ácido tricarboxílico da respiração mitocondrial para geração de energia na forma de ATP e ainda e especialmente porque estes aminoácidos são precursores glutamina, grande fornecedora de nitrogênio para síntese de bases nitrogenadas, influenciando positivamente na atividade celular (CALDER, 2006; LI *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2017). De maneira consolidada, demonstramos, pelo teste MTT, que a suplementação de ACR, tanto isoladamente quanto associada, levou a um aumento da atividade metabólica das CTMs.

Para complementar e justificar melhor o resultado da progressão do ciclo celular, avaliamos a expressão de algumas proteínas que participam da regulação e proliferação do ciclo: PCNA e c-Myc. O PCNA é considerado um marcador da proliferação celular e auxiliar da enzima DNA polimerase, para que o PCNA possa trocar dinamicamente várias proteínas de replicação, como o complexo ciclina A–Cdk2, e assim coordenar o processo replicativo (STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011). Corroborando com a literatura e com nossos resultados de proliferação celular, demonstramos maior expressão de PCNA nos grupos valina, leucina e BCAA. Além disso, o aumento da expressão de c-Myc foi observado nos grupos valina e BCAA, contribuindo para essa explicação, uma vez que o c-Myc é um fator de transcrição capaz de se ligar aos genes-alvo e entre suas funções, capaz de conduzir a progressão do ciclo celular (HOFFMAN; LIEBERMANN, 2008).

Correspondente a sua alta atividade sintética e proliferativa, as células imunológicas carecem de diversos nutrientes para suprir a sua necessidade metabólica. Os aminoácidos são notáveis em suas diversas funções, como: fontes de

energia, componentes estruturais, reguladores de vias biológicas, além de precursores de substâncias (SIDDIK; SHIN, 2019). Algumas células do sistema imune como: eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, são capazes de incorporar ACRs em proteínas e metabolizá-los (SKAPER; MOLDEN; SEEGMILLER, 1976; LI *et al.*, 2007). A relevância da função imunológica dos ACR foi demonstrada em um estudo com restrição nutricional. Os autores reduziram em 50% o conteúdo de ACR de uma dieta experimental e avaliaram a suscetibilidade à infecção bacteriana, verificaram que os animais restritos aos ACR apresentavam maior taxa de mortalidade e bactérias mais viáveis no fígado e baço (PETRO; BHATTACHARJEE, 1981).

O processo inflamatório é a principal maneira pela qual o sistema imunológico lida com infecções e danos nos tecidos. Algumas respostas e vias intracelulares são ativadas durante o processo inflamatório, como o NFκB e o STAT-3. Ambos são fatores de transcrição, que inicialmente são inativos em células não estimuladas (CAAMANO; HUNTER, 2002; VILLARINO *et al.*, 2015). No entanto, a ligação e o reconhecimento de alguns elementos, como o LPS, levam à fosforilação e consequente ativação deles (BEUTLER, 2003; DA SILVA LIMA *et al.*, 2013). Uma vez ativados, eles são capazes de migrar para o núcleo celular, onde regularão a transcrição de genes específicos relacionados ao processo inflamatório, especialmente a síntese de citocinas (KALTSCHMIDT; WIDERA; KALTSCHMIDT, 2005). O NF-κB é o fator de transcrição pró-inflamatória mais ativado, enquanto o STAT-3 induz a expressão de genes que têm funções anti-inflamatórias (GUPTA *et al.*, 2010; O'SHEA *et al.*, 2015). Dessa forma, observamos que a suplementação de ACR foi capaz de diminuir a expressão da razão p-NFκB / NFκB nos grupos valina, leucina e ACR e, por outro lado, a suplementação de BCAA aumentou a proporção de p-STAT-3 / STAT-3.

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são conhecidos receptores nucleares para ligantes como: esteroides, vitamina D e ácido retinóico. Dos 3 tipos de PPARs, destaca-se o PPAR- γ , encontrado principalmente em adipócitos e células imunológicas, sendo um importante regulador da diferenciação adipocitária, homeostasia da glicose e metabolismo de ácidos graxos (YOON *et al.*, 2000; VELLA *et al.*, 2017). Segundo TAJIRI; SHIMIZU, 2013, os ACRs aumentam a expressão de PPAR- γ no fígado, estimulando a oxidação de ácidos graxos livres, dessa forma os ACRs contribuem para melhora do quadro de resistência à insulina. O PPAR- γ , possui capacidade de se ligar ao complexo heterodimérico retinoide/receptor alfa – RXR- α , após a ligação há indução de elementos responsivos específicos do DNA (PPRES), levando a transcrição de genes relacionados a proliferação de peroxissomos, metabolismo lipídico, proliferação celular, diferenciação celular e ainda indução da apoptose (CAMPBELL; CARLBERG; KOEFFLER, 2008).

No atual trabalho encontramos aumento da expressão da relação p-PPAR- γ /PPAR- γ para o grupo suplementado com valina e o grupo BCAA. Segundo dados da literatura a ativação do PPAR- γ levou redução da ativação de NF κ B e consequente diminuição da síntese de TNF- α e IL-1 β (REMELS *et al.*, 2009). Algumas moléculas podem atuar como co-ativadores de PPAR- γ , como a proteína PGC-1 α (co-ativador de receptor ativado por proliferador de peroxissomo-1a) (LIANG; WARD, 2006). De acordo com TAJIRI; SHIMIZU, 2013, dietas ricas em ACRs, em ratos, podem aumentar a expressão da proteína PGC-1 α . No entanto, nas condições propostas neste trabalho, não encontramos influência significativa dos ACR na expressão da proteína PGC-1 α .

Os mediadores inflamatórios, são substâncias solúveis sintetizadas por uma grande diversidade de células durante o processo inflamatório, incluindo: citocinas,

óxido nítrico (NO), prostaglandinas e entre outros. As citocinas são polipeptídeos que atuam na comunicação celular, crescimento e diferenciação de linfócitos e ainda ativação de células efectoras (ABBAS, AK LICHTMAN AH, 2018). Elas podem apresentar características tanto pró-inflamatórias, como no caso de IL1 (α e β) e TNF α , mas também anti-inflamatórias como no caso da TGF- β . São sintetizadas a partir da transcrição de genes relacionados com a inflamação. De acordo com Lee HJ *et al*, 2017, a suplementação com ACRs é capaz de diminuir mediadores inflamatórios como IL-6 e NO e também levar a um efeito protetor contra danos induzidos por H₂O₂. Além disso, um estudo com micróglia de células de rato, suplementado com ACR, mostrou diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e, ao mesmo tempo, houve um aumento nos genes associados à resposta anti-inflamatória, como IL10 (DE SIMONE *et al.*, 2013).

Desde sua descoberta as CTMs foram exploradas pela capacidade imunomodulatória. Por meio da síntese de diversos mediadores solúveis, as CTMs possuem capacidade de alterar o status de ativação de alguns tipos celulares e ainda influenciar seu perfil sintetizador (JIANG; XU, 2020). Dessa maneira, a regulação da resposta imune pelas CTMs é mediada por vários fatores secretados e a ação imunorreguladora ou imunossupressora é dirigida por fatores como IL-10, NO, PGE2 e TGF- β (UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008; P. DE MIGUEL *et al.*, 2012; KYURKCHIEV, 2014) e por este motivo, testamos a influência dos ACR na síntese desses mediadores imunorregulatórios produzidos pelas CTMs.

IL-10 e TGF- β são citocinas anti-inflamatórias, com capacidade de inibir algumas ações das células imunes, regulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Nosso trabalho mostrou que isoleucina, valina e leucina isoladas ou em associação (grupo BCAA) foram capazes de aumentar a síntese da citocina TGF β . No entanto,

para a IL-10, nas condições por nós propostas, não encontramos diferenças significativas entre os grupos.

O óxido nítrico (NO), importante mediador inflamatório, possui característica de vasodilatador e espécie reativa de nitrogênio, colaborando para ampliação da inflamação e eliminação do antígeno (ABBAS, AK LICHTMAN AH, 2018). Além disso, o NO também é conhecido pelos efeitos anti-inflamatórios, inibindo não apenas a proliferação e função dos linfócitos T, mas também suprimindo a síntese de citocinas em Th1 e Th2 (JIANG; XU, 2020), em nosso trabalho, embora o grupo BCAA tenha sido observada uma tendência de aumento dos valores de NO, não encontramos valores estatisticamente significativos.

A prostaglandina E₂, importante mediador inflamatório, pode ser secretada pelas CTMs quando essas células adquirem perfil imunossupressor (HELDRING *et al.*, 2015). Existem relatos na literatura que a prostaglandina E₂ pode desencadear efeitos imunossupressores, e dessa forma inibir a proliferação de células NK, células dendríticas e ainda da citocina IL2. A PGE₂ interage com células imunes, levando à síntese de mediadores anti-inflamatórios, como IL-4, IL5 e IL10, e ao mesmo tempo inibe a síntese de fatores pró-inflamatórios, como o TNF- α (JIANG; XU, 2020). No presente estudo, o grupo suplementado com valina foi capaz de aumentar a síntese de PGE₂, mas nenhuma diferença estatística foi observada nos outros grupos estudados.

Como já mencionado anteriormente, as CTM, por sinalização parácrina, influenciam e modulam determinados ambientes. Por meio por meio da síntese de vários mediadores solúveis, as CTM têm capacidade de alterar o status de ativação de alguns tipos de células e ainda influenciar seu perfil sintetizador (ZHAO *et al.*,

2014). Optamos, nesse trabalho por avaliar a influência imunomoduladora das CTMs em macrófagos e linfócitos.

Macrófagos são células que desempenham muitas funções no sistema imunológico, com alta capacidade de secreção, incluindo enzimas, proteínas plasmáticas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas e citocinas (LEE *et al.*, 2017). De acordo com a literatura, as CTMs podem influenciar a diferenciação de macrófagos com o fenótipo M2, que expressa grandes quantidades de mediadores anti-inflamatórios (ABUMAREE *et al.*, 2013). Em corroboração, demonstramos que o sobrenadante das CTMs cultivadas em diferentes tipos de meios com ACRs não alterou a síntese de IL-10 pelos macrófagos. No entanto, o sobrenadante das CTMs cultivadas em valina foi capaz de diminuir a produção de IL-6 pelos macrófagos, e os sobrenadantes das CTMs de todos os grupos estudados foram capazes de diminuir a síntese de TNF- α pelos macrófagos.

Já os linfócitos, são células pertencentes ao sistema imune adaptativo e apresentam diferentes receptores, altamente específicos para antígenos distintos. Os dados da literatura são claros sobre a influência supressora das CTMs nos linfócitos por inibição da proliferação, bem como indução de apoptose e alteração na síntese do mediador imune (GU *et al.*, 2013). De acordo com a literatura, as CTMs são capazes de inibir a ativação do tipo de linfócito Th1 e, ao mesmo tempo, induzir a diferenciação e maturação do tipo de linfócito Th2 (GE *et al.*, 2010; CONSENTIUS *et al.*, 2015). Além disso, as CTMs são capazes de promover a diferenciação de linfócitos Treg, diretamente ou pela secreção de mediadores inflamatórios (MELIEF *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo, não encontramos efeitos significativos dos tratamentos na síntese de citocinas dos linfócitos.

6. CONCLUSÕES

- A suplementação, acima de concentrações fisiológicas, com ACRs foi capaz de expandir a capacidade de modulação das CTMs;
- Após receberem os ACR, as CTM apresentaram-se imunoregulatórias, com ênfase anti-inflamatória, com síntese aumentada de TGF- β e PGE₂;
- As CTM apresentam e expressão reduzida de fatores de transcrição inflamatória como NF κ B, corroborando com nossas conclusões a respeito de seu efeito anti-inflamatório, após tratamento com ACRs;
- Células Raw 264.7 que receberam sobrenadante de CTMs previamente tratadas com ACRs, diminuíram a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL6 e TNF α .

REFERÊNCIAS

- ABBAS, AK LICHTMAN AH, P. S. **Imunologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: 2018.
- ABUMAREE, M. H. et al. Human Placental Mesenchymal Stem Cells (pMSCs) Play a Role as Immune Suppressive Cells by Shifting Macrophage Differentiation from Inflammatory M1 to Anti-inflammatory M2 Macrophages. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 9, n. 5, p. 620–641, 28 out. 2013.
- AFANASYEV, B. V; ELSTNER, E. E.; ZANDER, A. R. founder of the mesenchymal stem cell concept Maximow and Friedenstein. www.ctt-journal.com **Cellular Therapy and Transplantation (CTT)**, v. 11, n. 3, p. 35–38, 2009.
- BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 4, p. 568–584, abr. 2004.
- BETZ, M., FOX, B. S. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. **J Immunol**, v. 146, p. 108–113, 1991.
- BEUTLER, B. Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness - the central role of the Toll-like receptors. **Critical care (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 39–46, fev. 2003.
- CAAMANO, J.; HUNTER, C. A. NF- B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 414–429, 1 jul. 2002.
- CALDER, P. C. Branched-Chain Amino Acids and Immunity. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 288S-293S, 1 jan. 2006.
- CAMPBELL, M. J.; CARLBERG, C.; KOEFFLER, H. P. A Role for the PPAR in Cancer Therapy. **PPAR Research**, v. 2008, p. 1–17, 2008.

CHOW, O.; BARBUL, A. Immunonutrition: Role in Wound Healing and Tissue Regeneration. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 1, p. 46–53, jan. 2014.

CHUANG, J. C.; YU, C. L.; WANG, S. R. Modulation of human lymphocyte proliferation by amino acids. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 81, n. 1, p. 173–176, 28 jun. 2008.

CIPRIANI, P. et al. Stem cells in autoimmune diseases: Implications for pathogenesis and future trends in therapy. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 7, p. 709–716, maio 2013.

CONSENTIUS, C. et al. Mesenchymal Stromal Cells Prevent Allostimulation In Vivo and Control Checkpoints of Th1 Priming: Migration of Human DC to Lymph Nodes and NK Cell Activation. **STEM CELLS**, v. 33, n. 10, p. 3087–3099, out. 2015.

CRUZAT, V. F.; KRAUSE, M.; NEWSHOLME, P. Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2014.

D'ANTONA, G. et al. Branched-Chain Amino Acid Supplementation Promotes Survival and Supports Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis in Middle-Aged Mice. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 4, p. 362–372, out. 2010.

DA SILVA LIMA, F. et al. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-κB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition. **European Journal of Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 1343–1351, 26 jun. 2013.

DAVIS, K. L. et al. Novel effects of nitric Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 41, n. 1, p. 203–236, abr. 2001.

DE BANDT, J.-P.; CYNOBER, L. Therapeutic Use of Branched-Chain Amino Acids in Burn, Trauma, and Sepsis. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 308S–313S, 1 jan. 2006.

DE GIROLAMO, L. et al. Mesenchymal stem/stromal cells: a new “cells as drugs” paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 13, p. 2459–73, 2013.

DE SIMONE, R. et al. Branched-chain amino acids influence the immune properties of microglial cells and their responsiveness to pro-inflammatory signals. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 5, p. 650–659, 2013.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DOS SANTOS, G. G. et al. L-Glutamine in vitro Modulates some Immunomodulatory Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 13, n. 4, p. 482–490, 2017.

EGEA, V. et al. TNF- α respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 5, p. 853–863, 3 maio 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental hematology**, v. 4, n. 5, p. 267–74, set. 1976.

GE, W. et al. Regulatory T-Cell Generation and Kidney Allograft Tolerance Induced by Mesenchymal Stem Cells Associated With Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression. **Transplantation**, v. 90, n. 12, p. 1312–1320, dez. 2010.

GHOSH, S.; DASS, J. F. P. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. **Gene**, v. 584, n. 1, p. 97–109, jun. 2016.

GILMORE, T. D.; GARBATI, M. R. Inhibition of NF- κ B Signaling as a Strategy in Disease Therapy. In: [s.l: s.n.]. p. 245–263.

GLENN, J. D. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 526, 2014.

GRIMBLE, R. F. Nutritional modulation of immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 60, n. 3, p. 389–397, 5 ago. 2001.

GU, Y. et al. Different roles of PD-L1 and FasL in immunomodulation mediated by human placenta-derived mesenchymal stem cells. **Human Immunology**, v. 74, n. 3, p. 267–276, mar. 2013.

GUPTA, S. C. et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10–12, p. 775–787, out. 2010.

HALL, JOHN EDWARD; GUYTON, A. C. Guyton & Hall. **Tratado de fisiologia médica**. Elsevier ed. Rio de Janeiro: 2017.

HELDRING, N. et al. Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. **Human Gene Therapy**, v. 26, n. 8, p. 506–517, ago. 2015.

HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6462–6472, 2008.

HUMPHREYS, B. D.; BONVENTRE, J. V. Mesenchymal Stem Cells in Acute Kidney Injury. **Annual Review of Medicine**, v. 59, n. 1, p. 311–325, fev. 2008.

JAIN, N. et al. Novel spectrophotometric quantitative estimation of hydrochlorothiazide in bulk drug and their dosage forms by using hydrotropic agent. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 2, n. 3, p. 11–14, 2010.

JANG, C. et al. A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 22, n. 4, p. 421–426, 2016.

JIANG, W.; XU, J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 1, 15 jan. 2020.

KALTSCHMIDT, B.; WIDERA, D.; KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF- κ B in the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1745, n. 3, p. 287–299, set. 2005.

KURODA, Y. et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 19, p. 8639–8643, 11 maio 2010.

KYURKCHIEV, D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 552, 2014.

LE BLANC, K.; DAVIES, L. C. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. **Immunology Letters**, v. 168, n. 2, p. 140–146, 2015.

LEE, J. H. et al. Anti-inflammatory and anti-genotoxic activity of branched chain amino acids (BCAA) in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 1371–1377, 2017.

LEYENDECKER JR., A. et al. The Use of Human Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Agents for the in vivo Treatment of Immune-Related Diseases: A Systematic Review. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 11 set. 2018.

LI, P. et al. Amino acids and immune function. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 237–252, 2007.

LI, W. et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 9, p. 1505–1513, 16 set. 2012.

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1 α : A key regulator of energy metabolism. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, v. 30, n. 4, p. 145–151, 2006.

LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 3, p. 65, 2013.

LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal stem cell repression of Th17 cells is triggered by mitochondrial transfer. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 232, 1 dez. 2019.

LYNCH, C. J. BCAA in metabolic signalling and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 10, n. 12, p. 723–736, 2014.

MARTIN, I. et al. Challenges for mesenchymal stromal cell therapies. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 480, p. eaat2189, 20 fev. 2019.

MEISEL, R. et al. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Leukemia**, v. 25, n. 4, p. 648–654, 18 abr. 2011.

MELIEF, S. M. et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. **STEM CELLS**, v. 31, n. 9, p. 1980–1991, set. 2013.

MU, W.-C. et al. Long-Term Effects of Dietary Protein and Branched-Chain Amino Acids on Metabolism and Inflammation in Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 918, 18 jul. 2018.

NAKANISHI, M. et al. DNA damage responses in skin biology—Implications in tumor prevention and aging acceleration. **Journal of Dermatological Science**, v. 56, n. 2, p. 76–81, nov. 2009.

NEGRO, M. et al. Branched-chain amino acid supplementation does not enhance athletic performance but affects muscle recovery and the immune system. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 48, n. 3, p. 347–51, set. 2008.

O'NEILL, L. A. .; KALTSCHMIDT, C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 252–258, jun. 1997.

O'SHEA, J. J. et al. The JAK-STAT Pathway: Impact on Human Disease and Therapeutic Intervention. **Annual Review of Medicine**, v. 66, n. 1, p. 311–328, 14 jan. 2015.

P. DE MIGUEL, M. et al. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 5, p. 574–591, 1 maio 2012.

PETRO, T. M.; BHATTACHARJEE, J. K. Effect of dietary essential amino acid limitations upon the susceptibility to *Salmonella typhimurium* and the effect upon humoral and cellular immune responses in mice. **Infection and immunity**, v. 32, n. 1, p. 251–9, abr. 1981.

RAITEN, D. J. et al. Inflammation and Nutritional Science for Programs/Policies and Interpretation of Research Evidence (INSPIRE). **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 5, p. 1039S-1108S, 1 maio 2015.

REMELS, A. H. V. et al. PPAR γ inhibits NF- κ B-dependent transcriptional activation in skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 1, p. 174–183, 2009.

REN, M. et al. Branched-chain Amino Acids are Beneficial to Maintain Growth Performance and Intestinal Immune-related Function in Weaned Piglets Fed Protein Restricted Diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 12, p. 1742–1750, 13 set. 2015.

REYES-SILVEYRA, J.; MIKLER, A. R. Modeling immune response and its effect on infectious disease outbreak dynamics. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 13, n. 1, p. 10, 5 dez. 2016.

ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 563–575, 2008.

SAKAIDA, I. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄ -induced liver fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1304–1311, dez. 2004.

SCHAFER, G.; SCHAUDER, P. Assessment of effects of amino acids and branched chain keto acids on leucine oxidation in human lymphocytes. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 48, n. 6, p. 531–536, 8 jan. 1988.

SHIMOMURA, Y. et al. Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Exercise and Liver Disease. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 250S-253S, 1 jan. 2006.

SIDDIK, M. A. B.; SHIN, A. C. Recent Progress on Branched-Chain Amino Acids in Obesity, Diabetes, and Beyond. **Endocrinology and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 234, 2019.

SKAPER, S. D.; MOLDEN, D. P.; SEEGMILLER, J. E. Maple syrup urine disease: Branched-chain amino acid concentrations and metabolism in cultured human lymphoblasts. **Biochemical Genetics**, v. 14, n. 7–8, p. 527–539, ago. 1976.

STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**, v. 107, n. 7, p. 1127–1140, 2011.

SURYAWAN, A. et al. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 1, p. 72–81, 1 jul. 1998.

TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y. Branched-chain amino acids in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 43, p. 7620–7629, 2013.

TÖGEL, F. et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 289, n. 1, p. F31–F42, jul. 2005.

TOM, A.; NAIR, K. S. Assessment of Branched-Chain Amino Acid Status and Potential for Biomarkers. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 324S-330S, 1 jan. 2006.

TSUKISHIRO, T. et al. Effect of branched-chain amino acids on the composition and cytolytic activity of liver-associated lymphocytes in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 8, p. 849–859, 25 ago. 2000.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–736, set. 2008.

ULIVI, V. et al. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Activity Is Modulated by Platelet Lysate: Induction of an Inflammatory Response and Secretion of Factors Maintaining Macrophages in a Proinflammatory Phenotype. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 16, p. 1858–1869, 15 ago. 2014.

VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 10, p. 700–714, 8 out. 2010.

VELLA, V. et al. PPAR- γ agonists as antineoplastic agents in cancers with dysregulated IGF axis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. FEB, 2017.

VILLARINO, A. V. et al. Mechanisms of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 1, p. 21–27, 1 jan. 2015.

WANG, Y. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1009–1016, 2014.

WU, G. Functional amino acids in nutrition and health. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 407–411, 18 set. 2013.

YOON, J. C. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Target Gene Encoding a Novel Angiopoietin-Related Protein Associated with Adipose Differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 14, p. 5343–5349, 15 jul. 2000.

ZHANG, S. et al. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 4–15, 2017.

ZHANG, Z. et al. Defining persistent critical illness based on growth trajectories in patients with sepsis. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 57, 18 dez. 2020.

ZHAO, X. et al. The Toll-like Receptor 3 Ligand, Poly(I:C), Improves Immunosuppressive Function and Therapeutic Effect of Mesenchymal Stem Cells on Sepsis via Inhibiting MiR-143. **STEM CELLS**, v. 32, n. 2, p. 521–533, fev. 2014.

ZHENG, C.; YIN, Q.; WU, H. Structural studies of NF- κ B signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 183–195, 7 jan. 2011.

ANEXO I- TERMO DE ACEITE DO ARTIGO

Ms. Ref. No.: NUT-D-20-00171R2

Title: Branched chain amino acids improve mesenchymal stem cell proliferation, reducing NFkB expression and modulating some inflammatory properties

Nutrition or its open access mirror

Dear Professor Fock,

I am pleased to confirm that your paper Branched chain amino acids improve mesenchymal stem cell proliferation, reducing NFkB expression and modulating some inflammatory properties **has been accepted for publication in Nutrition or Nutrition**: X, depending on which journal you chose during the submission process. We will ensure that we process your paper in the correct journal that you have chosen.

We look forward to publishing your paper and thank you for your contribution.

Kind regards,

Maria Isabel Correia

Deputy Editor-in-Chief

Nutrition or its open access mirror

ANEXO II- CURRÍCULO LATTES

Talita Sartori

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7461700008745564>
- ID Lattes: **7461700008745564**
- Última atualização do currículo em 09/01/2020

Atualmente professora na universitária (FMU) e aluna de doutorado do Laboratório de Hematologia Clínica da Universidade de São Paulo. Mestre em Ciências pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP. Possui graduação em Biomedicina pelo CENTRO UNIVERSITARIO UNIFMU (2008). Tem experiência na área de imunologia, com ênfase em inflamação e aspectos imunomodulatórios. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Talita Sartori

Nome em citações bibliográficas

SARTORI, T.; SARTORI, TALITA

Lattes ID

<http://lattes.cnpq.br/7461700008745564>

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Cidade Universitária

Butantã

05508900 - São Paulo, SP - Brasil

Telefone: (11) 30913639

Formação acadêmica/titulação

2016

Doutorado em andamento em Doutorado.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, Brasil.

Título: Influência dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre aspectos imunoregatórios das células tronco mesenquimais,

Orientador: Ricardo Ambrósio Fock.

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

2013 - 2016

Mestrado em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFkB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS, Ano de Obtenção: 2016.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock.

Palavras-chave: Glutamina; Taurina; Imunonutrição.

Grande área: Ciências Biológicas

Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.

2005 - 2008

Graduação em Biomedicina.

CENTRO UNIVERSITARIO UNIFMU, UNIFMU, Brasil.

Título: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VHC EM AMOSTRAS DE LEITE DE MÃES COM HEPATITE C.

Orientador: Dra. Norma de Paula Cavalheiro.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

Atuação Profissional

Hospital Sírio-Libanês, SIRIO-LIBANÊS, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Estagiária, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30

Outras informações

Atividades: exames de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética. Participação de seminários e aulas teóricas em radiologia.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - Atual

Vínculo: Mestranda, Enquadramento Funcional: Mestranda, Carga horária: 30

Outras informações

Realização do projeto de mestrado, intitulado como "Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS"

Vínculo institucional

2007 - 2008

Vínculo: iniciação científica, Enquadramento Funcional: iniciação científica, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

2006 - 2008

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiario, Carga horária: 20

Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual, IAMSPE, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2015

Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Executivo Público, Carga horária: 30

LAB.LAVOISIER DE ANALISES CLINICAS LTDA, LAC_FORN, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - 2010

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Biomedica, Carga horária: 36

Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, Brasil.

Vínculo institucional

2017 - Atual

Vínculo: Horista, Enquadramento Funcional: Professora

Projetos de pesquisa

2016 - Atual

Influência dos aminoácidos de cadeia ramificada sobre aspectos imunoregatórios das células tronco mesenquimais
Descrição: O sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo além do reparo de tecidos, devido sua importância, muitos estudos têm dedicado sua atenção à investigação dos mecanismos imunológicos e de fatores que possam modulá-lo. A imunoterapia corresponde a um mecanismo de restabelecimento do equilíbrio da resposta imune, de maneira que ocorra sem prejuízos na efetividade da sua defesa contra infecções e ao mesmo tempo minimizando as potenciais consequências nocivas resultantes do processo inflamatório. Visando este objetivo, a imunoterapia celular utiliza células que possuem capacidade de interagir com o sistema imunológico, induzindo respostas imunes seletivas e equilibradas. As células tronco mesenquimais (CTMs) tem atraído cada vez mais atenção devido sua capacidade terapêutica. Nos dias atuais inúmeros são os avanços a respeito da influência que nutrientes específicos podem exercer sobre o sistema imune. Os aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) são aminoácidos de extrema importância para manutenção proteica de indivíduos adultos. Uma vez que os ACR possam ter efeito imunomodulatório, optamos então neste trabalho, por investigar os efeitos dos ACR sobre aspectos da resposta imunológica em células tronco mesenquimais..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Talita Sartori - Integrante / Ricardo Ambrósio Fock - Coordenador.

2013 - 2016

Efeitos da glutamina e taurina sobre a via de sinalização do NFκB em células Raw 264.7 estimuladas com LPS

Descrição: Sabendo-se que os aminoácidos glutamina e taurina apresentam papel importante na modulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1 e IL-6, pretendemos nesse trabalho investigar a participação da glutamina, da taurina e suas associações sobre a via de sinalização do fator nuclear Kappa-B (NF-κB) (principal via da resposta inflamatória e imune) e a produção de citocinas pró e anti inflamatórias em macrófagos estimulados com LPS (Lipopolissacarídeo)..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Talita Sartori - Coordenador / Ricardo Fock - Integrante.

2007 - 2008

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VHC EM AMOSTRAS DE LEITE DE MÃES COM HEPATITE C

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Talita Sartori - Coordenador.

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia.

2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia / Subárea: Imunologia Celular.

Idiomas

Inglês

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

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **SARTORI, TALITA**; GALVÃO DOS SANTOS, GUILHERME ; NOGUEIRA-PEDRO, AMANDA ; MAKIYAMA, EDSON ; ROGERO, MARCELO MACEDO ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO . Effects of glutamine, taurine and their association on inflammatory pathway markers in macrophages. INFLAMMOPHARMACOLOGY **JCR**, v. . ., p. . ., 2017.
2. DOS SANTOS, GUILHERME GALVÃO ; HASTREITER, ARACELI APARECIDA ; **SARTORI, TALITA** ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO . L-Glutamine in vitro Modulates some Immunomodulatory Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Stem Cell Reviews and Reports **JCR**, v. 13, p. 482-490, 2017.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **SARTORI, T.**; Nogueira-Pedro A ; Makiyama EN ; SANTOS, G. G. ; FOCK, R. . The influence of glutamine on immunomodulatory aspects of Raw 264.7 cells. In: Metabolic Regulation, 2016, São Paulo. Metabolic Regulation, 2016.
2. ★ SANTOS, G. G. ; Araceli Hastreiter ; **SARTORI, T.** ; BORELLI, P. ; Ricardo A. Fock . The influence of l-glutamine on immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells from malnourished mice. In: 43rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Experimental Haematology4., 2014, Montreal. Experimental Hematology, 2014. v. 42. p. S33-S33.
3. **SARTORI, T.**; MELO, C. E. ; Morinitsu, Suzana Rie ; CAVALHEIRO, N. P. ; Barone, Antonio Alci . Avaliação da presença do vírus da Hepatite C em amostras de leite de mães com viremia.. In: Sétimo Congresso Nacional de Iniciação Científica e Quinto Congresso Internacional de Iniciação Científica, 2007, Sorocaba. Avaliação da presença do vírus da Hepatite C em amostras de leite de mães com viremia., 2007.

Artigos aceitos para publicação

1. ★ DOS SANTOS, GUILHERME GALVÃO ; BATTOOL, SHAFQAT ; HASTREITER, ARACELI ; **SARTORI, TALITA** ; NOGUEIRA-PEDRO, AMANDA ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, RICARDO AMBROSIO . The influence of protein malnutrition on biological and immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells. Clinical Nutrition (Edinburgh) **JCR**, 2016.
2. OLIVEIRA, D.C ; SANTOS, A. C. A. ; **SARTORI, T.** ; LIMA, F. S. ; ROGERO, M. M. ; Ricardo A. Fock . Glutamine metabolism and its effects on immune response: Molecular mechanism and gene expression. Nutrire (São Paulo), 2016.

Apresentações de Trabalho

1. **SARTORI, T.**; Ricardo A. Fock ; SANTOS, A. C. A. ; Makiyama EN . Glutamine evaluation on immunomodulatory aspects of Raw 264.7 cells. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. **SARTORI, T.**; SANTOS, G. G. ; SANTOS, A. C. A. ; Makiyama EN ; Ricardo A. Fock . Glutamine evaluation on immunomodulatory aspects of Raw 264.7 cells. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. **SARTORI, T.**; NOGUEIRA-PEDRO, AMANDA ; Makiyama EN ; DOS SANTOS, GUILHERME GALVÃO ; FOCK, R. . The Influeny of Glutamine on Immunomodulatory Aspects of Raw 264.7 Cells.. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Demais tipos de produção técnica

1. Victor, J.R ; **SARTORI, T.** . Conceitos e Inovações em Imunologia. 2016. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Bancas

Participação em bancas de trabalhos de conclusão

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **SARTORI, T.**. Participação em banca de Danielle Dias Pereira. O uso de benzodiazepínicos associados ao risco de demência em idosos. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.
2. **SARTORI, T.**. Participação em banca de Maria Suzana Santana Amorin e Catiele B. Fabricio da Silva. Anti-inflamatórios. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.
3. **SARTORI, T.**. Participação em banca de Juliane Andrade Oliveira. Fármacos auxiliares no tratamento de doenças como vitiligo e Psoríase. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.
4. **SARTORI, T.**. Participação em banca de Mislene Rodrigues Braga. Atenção farmacêutica com cuidados do paciente com Alzheimer. 2018.
5. **SARTORI, T.**. Participação em banca de Franciele Viera Jesus dos Santos. Biscoito multivitamínico de A a Z. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.

6.SARTORI, T.; ALVARIM, L. T.. Participação em banca de Anderson Luiz Batista Emygdio. Técnicas aplicadas em análises toxicológicas em matrizes biológicas de interesse forense. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.

7.SARTORI, T.; ALVARIM, L. T.. Participação em banca de Danielle Migotto. Derivados da cannabis sativa no tratamento da esclerose múltipla. 2017.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Workshop Internacional Conceitos Contemporâneos em Resistência Bacteriana. 2018. (Outra).

2. 3º Congresso de Graduação da Universidade de São Paulo. 2017. (Congresso).

3. Curso de Hematologia Laboratorial. 2017. (Outra).

4. Febrace. Ouvir voluntário. 2017. (Feira)

5. X Simpósio Sul de Imunologia. Glutamine evaluation on immunomodulatory aspects of Raw 264.7 cells. 2017. (Simpósio).

6. Curso de férias imunologia USP. 2016. (Outra).

7. Curso em Suplementação Alimentar no Exercício e no Esporte. 2016. (Outra).

8. Progress on alternative in vitro methods for the safety assessment of chemicals and their impact on human health: international and Brazilian views. 2015. (Outra).

9. SBAN. 2015. (Congresso).

10. 43rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Experimental Haematology. The influence of l-glutamine on immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells from malnourished mice. 2014. (Congresso).

11. Jornada Paulista de Radiologia. 2008. (Outra).

12. Sétimo Congresso Nacional de Iniciação Científica e Quinto Congresso Internacional de Iniciação Científica. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VHC EM AMOSTRAS DE LEITE DE MÃES COM HEPATITE C. 2007. (Congresso).

13. Terceiro Simpósio de Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP. 2007. (Simpósio).

14. Curso sobre Hepatites Virais. 2006. (Outra).

15. Curso de coleta de materiais biológicos- Biosciences.aluna. 2005. (Outra).

16. Feiras da Saúde. trabalho voluntário. 2005. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1.SARTORI, T.; FERNANDES, C. . MINI SIMPÓSIO DE ANÁLISES TOXICOLÓGICAS E FORENSES. 2018. (Outro).

Orientações

Orientações e supervisões concluídas

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. GABRIELA BUENO DE AZEVEDO SEIXAS MILTON CÉSAR DE CAMPOS. RESVERATROL ASSOCIADO AO TRATAMENTO DA NEFROPATIA DIABÉTICA. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Talita Sartori.

2. LARISSA RENATA DE OLIVEIRA TEIXEIRA PIGOZZI. TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL Clostridium difficile. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Talita Sartori.

3. Vanessa Pedreira Rocha e Jaala Raquel Silva Lima. O uso da microbiota no tratamento da doença de Crohn. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia) - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas. Orientador: Talita Sartori.

ANEXO III- FICHA DO ALUNO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Documento sem validade oficial****FICHA DO ALUNO****9142 - 8720690/1 - Tálita Sartori**

Email:	sartori_40@usp.br
Data de Nascimento:	14/10/1986
Cédula de Identidade:	RG - 24.883.927-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Faculdades Metropolitanas Unidas - São Paulo - Brasil - 2009
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 - 07/03/2018 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 16/05/2018
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: 10/03/2020 07:03:39

9142 - 8720690/1 - Tálita Sartori

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMI5899-1/2	Aprimoramento Didático no Ensino da Imunologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	08/08/2016	21/11/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/3	Aprimoramento Pedagógico	16/08/2016	12/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
BMI5898-1/2	O Ensino de Imunologia para Cursos de Graduação (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/10/2016	24/11/2016	120	8	93	A	N	Concluída
FBC5792-4/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	07/03/2017	19/06/2017	15	1	100	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
FBC5766-6/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV	15/08/2017	27/11/2017	15	1	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

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: 10/03/2020 07:03:39