

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Nutrição Experimental

JULIANA GIMENEZ CASAGRANDE

Efeito da ingestão do suco de uva integral sobre a migração de leucócitos em mulheres com sobrepeso. Participação da delphinidina-3-glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular

SÃO PAULO  
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Nutrição Experimental

JULIANA GIMENEZ CASAGRANDE

Efeito da ingestão do suco de uva integral sobre a migração de leucócitos em mulheres com sobrepeso. Participação da delfinidina-3-glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos  
Área de Nutrição Experimental

Orientador:  
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

SÃO PAULO  
2023

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

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

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

C334e Casagrande, Juliana Gimenez  
Efeito da ingestão do suco de uva integral sobre a migração de leucócitos em mulheres com sobrepeso. Participação da delfinidina-3-glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular / Juliana Gimenez Casagrande. - São Paulo, 2023.  
75 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Delfinidina. 2. Inflamação . 3. Migração celular. 4. C1498. 5. Moléculas de adesão. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

JULIANA GIMENEZ CASAGRANDE

Efeito da ingestão do suco de uva integral sobre a migração de leucócitos em mulheres com sobrepeso. Participação da delphinidina-3-glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular.

Tese para obtenção do Título de Doutor; Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos; Área de Nutrição Experimental

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock  
orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

## **DEDICATÓRIA**

A mim por ser a protagonista de todas as inúmeras batalhas para chegar até aqui. Aos meus pais por todo apoio e encorajamento. Ao meu filho por ser a razão principal de todos os meus esforços.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e toda espiritualidade que me fortaleceram e ampararam nos momentos de fragilidade.

Ao professor orientador Dr. Ricardo Ambrósio Fock, ao qual devo gratidão imensurável desde os primeiros momentos. Gratidão por acreditar e depositar em mim confiança tamanha e que por muitas vezes eu mesma duvidava. Gratidão pelo impulsionamento incansável e pelo ser humano e profissional inspirador que é.

Ao Professor Dr. Marcelo Macedo Rogero e sua equipe, do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, pelas contribuições realizadas ao trabalho.

A minha querida amiga Luciene Assaf de Matos que compartilhou comigo angústias e alegrias ao longo de todo caminho.

Ao técnico do laboratório de Hematologia Clínica, Edson Naoto Makiyama, por toda ajuda, dedicação e paciência durante meus treinamentos.

Aos amigos do laboratório de Hematologia Clínica Experimental que compartilharam ensinamentos e apoio ao longo desses anos.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2021/08658-1) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 303579/2021-8).

A minha família por toda compreensão e motivação.

## EPÍGRAFE

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

*Isaac Newton*

## RESUMO

CASAGRANDE, J.G. **Efeito da ingestão do suco de uva integral sobre a migração de leucócitos em mulheres com sobrepeso. Participação da delphinidina-3-glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular.** 2023. 75f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Concentrações aumentadas de tecido adiposo corporal observadas no sobrepeso e obesidade, podem gerar a produção de diversos mediadores inflamatórios com ação direta ou indireta em influenciar a capacidade de proliferação e diferenciação das células hematopoéticas e, conseqüentemente, a complexa regulação que envolve os processos de migração celular. Sabe-se que o recrutamento contínuo de leucócitos durante vários estágios do processo inflamatório apresenta importante papel na gênese desse processo, participando intensamente na perpetuação da inflamação. Na literatura, vários estudos demonstraram a capacidade anti-inflamatória das antocianinas sobre vários órgãos; contudo poucos estudos avaliam a influência das antocianinas sobre a migração celular. As antocianinas pertencem à ampla classe dos flavonoides que estão presentes em uma ampla variedade de frutas, vegetais e bebidas e são os compostos responsáveis pelas cores azul, violeta e vermelha desses alimentos. Sendo assim, pretende-se nesse estudo avaliar o efeito da delphinidina-3-glicosídeo, uma antocianina presente em abundância em diversas frutas com destaque para o suco de uva integral, sobre os processos de migração leucocitária. Para tanto esse trabalho foi dividido em duas etapas: *(i)* uma realizada em pacientes com sobrepeso que consumiram suco de uva integral e *(ii)* uma segunda etapa, *in vitro*, onde foi avaliado o efeito da delphinidina-3-glicosídeo sobre mecanismos envolvidos na modulação dos processos de migração leucocitária. Na etapa inicial com estudos *in vivo*, foram avaliados parâmetros bioquímicos, hematológicos, bem como a expressão de moléculas de adesão de células polimorfonucleares do sangue periférico e a quantificação de citocinas inflamatórias e alguns genes envolvidos nos processos de inflamação e migração celular. Na primeira etapa, a ingestão de suco de uva não alterou o perfil lipídico/inflamatório ou a contagem de leucócitos, entretanto, reduziu os valores circulantes de sICAM e sVCAM. Na segunda etapa, os resultados *in vitro* mostraram que a delphinidina reduziu a taxa de migração e a expressão de células CD11/CD18 positivas, reduziu a expressão gênica de ICAM-1 e a fosforilação e expressão gênica de NFkB, reduzindo também a produção de IL-6, IL-8 e CCL2. **Palavras-chaves:** delphinidina, inflamação, migração celular, C1498.



## ABSTRACT

CASAGRANDE, J.G. **Effect of whole grape juice intake on leukocyte migration in overweight women. Participation of delphinidin-3-glycoside as a potential modulator of inflammatory profile and cell migration.** 2023. 75f. Thesis (Doctorate). School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Increased concentrations of body adipose tissue observed in overweight and obesity may generate the production of several inflammatory mediators that can act directly or indirectly on the hematopoietic cells capacity of proliferation and differentiation and, consequently, the complex regulation that involves the processes of cell migration. It is known that the continuous recruitment of leukocytes during various stages of the inflammatory process plays an important role in the genesis of this process, intensely participating in the perpetuation of inflammation. In the literature, several studies have demonstrated the anti-inflammatory capacity of anthocyanins on various organs; however, few studies have evaluated the influence of anthocyanins on cell migration. Anthocyanins belong to the broad class of flavonoids that are present in a wide variety of fruits, vegetables and beverages and are the compounds responsible for the blue, violet and red colors of these foods. Thus, this study intends to evaluate the effect of delphinidin-3-glycoside, an anthocyanin present in abundance in several fruits, especially whole grape juice, on leukocyte migration processes. Therefore, this study was divided into two stages: *(i)* one performed in overweight patients who consumed whole grape juice and *(ii)* a second stage, *in vitro*, where the effect of delphinidin-3-glycoside on mechanisms involved in the modulation of leukocyte migration processes was evaluated. In the initial stage with *in vivo* studies, biochemical and hematological parameters were evaluated, as well as the expression of adhesion molecules of polymorphonuclear cells of peripheral blood and the quantification of inflammatory cytokines and some genes involved in the processes of inflammation and cell migration. In the first stage, the intake of grape juice did not alter the lipid/inflammatory profile or the leukocyte count, however, it reduced the circulating values of sICAM and sVCAM. In the second step, *in vitro* results showed that delphinidine reduced the migration rate and expression of CD11/CD18 positive cells, reduced ICAM-1 gene expression and NFkB phosphorylation and gene expression, and also reduced IL-6, IL-8 and CCL2 production.

**Keywords:** delphinidin, inflammation, cellular migration, C1498.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT-1: Proteína quinase  
ALT: Alanina aminotransferase  
AP-1: Proteína ativadora-1  
AST: Aspartato aminotransferase  
CC: Circunferência da cintura  
CD11/CD18: Integrinas leucocitárias  
C1498: Linfoblasto (leucemia mielóide aguda)  
CD34: Receptor da L-selectina  
CD4/CD8: Linfócitos T  
CD62L: Selectina  
cDNA: DNA complementar  
COX-2: Ciclo oxigenase-2  
CQ: Circunferência do quadril  
DCNT: Doença crônica não transmissível  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DPPH: Radical livre estável 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil  
ECA: Enzima conversora da angiotensina  
EDTA K3: Edetetic acid  
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
ERK: Extracellular signal-regulated kinases  
EROS: Espécies reativas de oxigênio  
ET-1: Endotelina 1  
fMLP: N-formil-Metionil-Leucyl-Phenylalanine  
Gama GT: Gama glutamil transferase  
GSH: Glutathiona peroxidase  
HCT: Hematócrito  
HDL: High density lipoprotein  
HgB: Hemoglobina  
HUVECs: Células endoteliais vasculares umbilicais humanas  
I $\kappa$ B- $\alpha$ : Inibidor do NF $\kappa$ B  
IKK: Proteína quinase

IL-1: Interleucina 1  
IL-10: Interleucina 10  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$   
IL-6: Interleucina 6  
IL-8: Interleucina 8  
IMC: Índice de massa corporal  
IRS1: Receptor de insulina-1  
IRS2: Receptor de insulina-2  
JNK: c-Jun N-terminal  
KC: Keratinocyte-derived chemokine  
LDL: Low density lipoprotein  
LPS: Lipopolissacarídeo  
MAPK: Proteína quinase  
MCP-1/CCL2: Monocyte Chemoattractant Protein-1  
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase 1  
MIP-2: Macrophage-inflammatory protein 2  
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio  
MyD88: Proteína de diferenciação mielóide 88  
NF $\kappa$ B2: Fator de transcrição nuclear kappa B2  
Nf $\kappa$ Bia: Fator de transcrição nuclear kappa Bia  
NF $\kappa$ B: Fator de transcrição nuclear kappa B  
NOS: Nitric oxide synthase  
ORAC: Oxygen radical absorbance capacity  
Ox-LDL: LDLc oxidada  
P38: Proteína quinase  
PA: Pressão arterial  
PBS: Phosphate-buffered saline  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
PI3K: Fosfoinositol-3 quinase  
PMN: Polimorfonucleares  
RCQ: Relação cintura-quadril  
RIPA: Radioimmuno Precipitation Assay  
TG: Triglicérides  
TLR4: Receptores do tipo Toll 4

TNFR: Receptor TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral

WBC: White blood cells

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Etapas do processo de rolagem, adesão e migração leucocitária.
- Figura 2 - Estrutura química da delfinidina.
- Figura 3 - Resumo do sistema de defesa antioxidante.
- Figura 4 - Delineamento do estudo.
- Figura 5 - Resultados dos parâmetros antropométricos.
- Figura 6- Resultados de Pressão arterial sistólica (PA sistólica) e Pressão arterial diastólica (PA diastólica).
- Figura 7 - Resultados de glicemia, triglicerídeos (TG), colesterol total, Lipoproteína de alta densidade (HDL), Lipoproteína de baixa densidade (LDL).
- Figura 8 - Resultados de Alanina aminotransferase (ALT); Gama glutamiltransferase (GGT); Aspartato aminotransferase (AST) e Amilase.
- Figura 9 - Resultados de Uréia e Creatinina.
- Figura 10 - Resultados de Proteína C Reativa (PCR); Progesterona; Fibrinogênio e D- dímero.
- Figura 11 - Dosagem de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e MCP-1.
- Figura 12 - Dosagem de VCAM e ICAM.
- Figura 13 - Resultados de hemoglobina (Hgb); hematócrito (HCT); contagem de glóbulos vermelhos (RBC); contagem de glóbulos brancos (WBC); plaquetas (PLT); Bastonetes; Segmentados; Eosinófilos; Basófilos; Linfócitos e Monócitos.
- Figura 14 - Estratégia de análise referente à marcação fenotípica FSC x SSC de células do sangue periférico.
- Figura 15 - Resultados da porcentagem da marcação fenotípica de CD4, CD8, razão CD4/CD8 e MFI de CD14; CD11 e CD18.
- Figura 16 - Valores da expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, CD18, NFKB e NFKB $\alpha$  nos polimorfonucleados.
- Figura 17 - Resultados da citotoxicidade celular segundo ensaio colorimétrico MTT em células C1498 cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de delfinidina, e estimuladas ou não com LPS.
- Figura 18 - Estratégia de análise referente ao ciclo celular e apoptose das células C1498 cultivada *in vitro*.

- Figura 19 - Resultados do ciclo celular por citometria de fluxo do grupo sem estímulo de LPS em células C1498 cultivadas *in vitro* em diferentes doses de delfinidina.
- Figura 20 - Resultados da apoptose e viabilidade celular por citometria de fluxo do grupo sem estímulo de LPS em células C1498 cultivadas *in vitro* em diferentes doses de delfinidina.
- Figura 21 - Valores das concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e CCL2 em células C1498 cultivadas *in vitro*.
- Figura 22 - Resultado dos efeitos da delfinidina na expressão de NF- $\kappa$ B total e fosforilado.
- Figura 23- Estratégia de análise referente à marcação fenotípica de células C1498 cultivadas *in vitro* nos grupos controle, delfinidina, LPS e LPS + delfinidina com marcadores CD11b e CD18.
- Figura 24 - Resultados da porcentagem da dupla marcação fenotípica de CD11b<sup>+</sup>/CD18<sup>+</sup> em células C1498 cultivadas *in vitro*.
- Figura 25 - Efeitos da delfinidina sobre a migração da linhagem celular C1498.
- Figura 26 - Efeitos da delfinidina sobre a expressão gênica de NFKB2, NOS2, STAT3, AKT1, IL-6, ICAM-1 e PECAM-1 em células da linhagem celular C1498 cultivadas *in vitro*.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Composição nutricional do suco de uva integral.

Tabela 2 - Concentração de antocianinas no suco de uva integral.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 Sobrepeso, Obesidade e Inflamação .....	18
1.2 Inflamação e citocinas .....	19
1.3 Migração leucocitária .....	21
1.4 Suco de uva e antocianinas .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Etapa 1 ( <i>in vivo</i> ) .....	27
3.1.1 População do estudo .....	27
3.1.2 Critérios de inclusão .....	28
3.1.3 Critérios de exclusão .....	28
3.1.4 Caracterização dos participantes .....	29
3.1.5 Delineamento do estudo .....	29
3.1.6 Suco de uva integral .....	30
3.1.7 Análise bioquímica e determinação da concentração sérica de biomarcadores inflamatórios .....	31
3.2 Sangue periférico .....	31
3.2.1 Hemograma .....	31
3.2.2 Citometria de Fluxo .....	31
3.2.3 Separação das células polimorfonucleares .....	32
3.2.4 rtPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real) .....	32
3.3 Etapa II ( <i>in vitro</i> ) .....	33
3.3.1 Análise <i>in vitro</i> .....	33
3.3.2 Ensaio de citotoxicidade celular .....	34
3.3.3 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo .....	34
3.3.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	34
3.3.5 Dosagem de citocinas .....	35
3.3.6 Western Blot NFkB total e fosforilado.....	35
3.3.7 Citometria de Fluxo .....	36
3.3.8 Ensaio de migração de células C1498 .....	36
3.3.9 rtPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real) .....	36
3.3.10 Análise estatística .....	37



<b>4. RESULTADOS <i>in vivo</i></b> .....	<b>37</b>
4.1 Avaliação da composição do suco de uva .....	37
4.2 Dados do estudo .....	38
4.3 Antropometria.....	38
4.3.1 Peso e Índice de Massa Corporal (IMC) .....	38
4.3.2 Circunferência da cintura (CC) e Relação cintura quadril (RCQ) .....	38
4.3.3 Avaliação física .....	39
4.3.4 Avaliação bioquímica .....	40
4.3.5 Interleucinas e moléculas de adesão .....	43
4.3.6 Avaliação hematológica .....	44
4.4 Citometria de Fluxo .....	46
4.4.1 Imunofenotipagem leucocitária .....	46
4.5 Avaliação Biologia Molecular (rtPCR) .....	48
<b>5. RESULTADOS <i>in vitro</i></b> .....	<b>50</b>
5.1 Ensaio de proliferação celular .....	50
5.2 Avaliação do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo.....	51
5.3 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo .....	52
5.4 Avaliação de citocinas produzidas por C1498 .....	53
5.5 Avaliação da expressão de NFkB total e fosforilado .....	54
5.6 Imunofenotipagem celular da linhagem C1498.....	55
5.7 Efeito da delfinidina sobre a migração celular da linhagem C1498.....	57
5.8 Avaliação Biologia Molecular (rtPCR) .....	58
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>73</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Sobrepeso, Obesidade e Inflamação

Entre 1975 e 2016, a incidência global de obesidade registrou um aumento de três vezes, e essa tendência persiste, afetando significativamente a maioria dos habitantes do planeta, visto que, em muitos países, o excesso de peso e a obesidade emergem como determinantes primordiais nos casos de mortalidade (WHO, 2018).

Segundo os dados do Vigitel 2021, constatou-se que 22,4% dos adultos brasileiros são classificados como obesos, revelando uma incidência semelhante tanto entre homens quanto mulheres. Por outro lado, o sobrepeso afeta 57,2% da população adulta, com uma prevalência ligeiramente maior entre os homens (BRASIL, 2022).

A obesidade é um fenômeno pandêmico e abrangente, transcendendo barreiras étnicas e socioeconômicas em todo o mundo. Seu impacto se estende tanto para países com alto, médio e baixo poder aquisitivo, especialmente nas regiões urbanas. Homens e mulheres de todas as idades são afetados por esse problema de saúde. Caracterizada como uma condição multifatorial, a obesidade resulta da interação complexa entre fatores genéticos e o ambiente circundante. Apesar dos esforços em pesquisa, ainda há muito a ser desvendado sobre os movimentos fisiopatológicos subjacentes a essa condição preocupante (WANNMACHER 2016, WHO 2015).

Classifica-se como obesidade os indivíduos cujo Índice de Massa Corporal (IMC) é maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup>, e sobrepeso quando o IMC está entre 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> (WHO,1995).

A obesidade está associada a diversos desvios do estado fisiológico normal. A inflamação em estados de obesidade se mostra um tanto quanto peculiar, onde ocorre a manifestação de um baixo grau inflamatório sem a existência de infecção, indução autoimune ou injúria massiva. No entanto, a complexidade desse estado inflamatório ainda está por ser totalmente desvendada (MONTEIRO; AZEVEDO 2010).

Os alimentos ultraprocessados ganharam uma presença cada vez maior na dieta dos brasileiros, o que reflete uma transformação significativa nos hábitos alimentares ao longo das últimas décadas. Esses produtos possuem uma densidade energética elevada e contêm excesso de açúcar adicionado, gordura saturada, gordura total e gordura trans, ao passo que possuem teor reduzido de fibras, vitaminas e minerais. Como resultado, eles são considerados um fator de risco significativo no desenvolvimento de condições como

obesidade, diabetes mellitus e outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), de acordo com estudos de Monteiro (2019), Louzada (2015) e Louzada (2019).

O aumento de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda (proteína C-reativa por exemplo), recrutamento de leucócitos e ativação de leucócitos teciduais são algumas das respostas inflamatórias desencadeadas pela obesidade, referida como “metainflamação” (inflamação metabólica) (GE, *et al.*, 2014).

## **1.2 Inflamação e citocinas**

O excesso de tecido adiposo, também depositado nas vísceras, gera um estado inflamatório de baixo grau que eventualmente desencadeia a resistência à insulina e está associada com as comorbidades da síndrome metabólica como hipertensão, aterosclerose, dislipidemia e diabetes mellitus (ACHIKE *et al.* 2011).

O consumo elevado de lipídios, especialmente gorduras saturadas, pode também propiciar resistência periférica à insulina, visto que esses lipídios se conectam aos receptores do tipo Toll 4 (TLR4), ativando as vias JNK e IKK. Essas vias, por sua vez, levam à fosforilação de resíduos de serina no IRS1 (receptor de insulina-1), desencadeando sua ubiquitinação e, conseqüentemente, diminuindo a eficácia da ação insulínica. Adicionalmente, essa alta ingestão de gorduras saturadas estimula a transcrição do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) e da proteína ativadora-1 (AP-1), o que acarreta em um aumento da expressão de genes pró-inflamatórios. Isso pode contribuir para processos inflamatórios no organismo, agravando o cenário de resistência à insulina (MAJOLO e REIS, 2018).

O estudo de Monteiro e Azevedo (2010) afirma que a inflamação é um processo fisiológico de proteção do organismo contra danos de origem química, física ou fisiológica. A resposta imune é um complexo sistema que envolve a participação de leucócitos (linfócitos, monócitos e neutrófilos), essas células encontram-se circulantes no sangue periférico. Essas células produzem uma série de mediadores como citocinas, aminas vasoativas, eicosanóides entre outras, culminado na efetivação da resposta imune. A ativação de moléculas do endotélio permite a migração de neutrófilos e extravasamento de substâncias solúveis para os tecidos onde essas células se tornarão ativadas e executarão as suas funções para a eliminação de possíveis agentes infecciosos. Citocinas são moduladores importantes da inflamação, participam nos processos inflamatórios através de uma rede complexa e às vezes, aparentemente de contraditórias interações. Citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) atuam no

aumento da expressão de receptores de superfície em células do endotélio vascular, aumentando a adesividade de leucócitos, inicialmente de neutrófilos e subsequentemente de monócitos e linfócitos. Portanto os mediadores inflamatórios possuem um relevante papel na modulação da inflamação que se encontram elevados em indivíduos obesos (CONTRAN, et al., 2000, ALLEVA, et al., 1997, TURNER et al. 2014, CONAWAY, 2017).

Ácidos graxos saturados têm a capacidade de estimular diretamente os receptores do tipo TLR4, desencadeando, por conseguinte, um aumento na atividade do fator de transcrição nuclear NFκB (LEE et al., 2001). Esse evento é seguido pelo recrutamento de proteínas intracelulares adaptadoras, notadamente a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), resultando na ativação da via de sinalização do NFκB. Esse processo, por sua vez, provoca a fosforilação de proteínas quinases, incluindo o complexo de quinases IKB (IKK). O complexo IKK é constituído por duas subunidades catalíticas, IKK-α e IKK-β, e uma subunidade regulatória, IKKγ, que é responsável por induzir a fosforilação do inibidor do NFκB, conhecido como IκB-α. A fosforilação do IκB-α permite que o NFκB seja transportado para o núcleo celular, onde ocorre a ativação da transcrição de diversos genes de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-6. Esse mecanismo de ativação do NFκB e a subsequente expressão de citocinas pró-inflamatórias têm um papel importante na regulação da resposta inflamatória do organismo (KARALIS et al., 2009; THIEMERMANN E MOHAMMAD, 2021). Além disso, o NFκB desempenha um papel crucial na estimulação da síntese de IκB, que, por sua vez, atua como um regulador negativo, interagindo com o NFκB e suprimindo sua ativação (HATADA et al., 2000; MAGNANI et al., 2000; DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002; FUJIHARA et al., 2003; KAWAI e AKIRA, 2005).

O TNF-α, ao se ligar ao seu receptor TNFR, inicia uma cascata de sinalização que resulta na ativação de proteínas pertencentes à família das quinases ativadas por sinais mitogênicos (MAPK), como a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), p38 e c-Jun N-terminal (JNK), desencadeando, por sua vez, a ativação do fator de transcrição conhecido como proteína ativadora-1 (AP-1) (SUGANAMI e OGAWA, 2010). A ativação das quinases IKK-β e JNK leva à fosforilação dos substratos do receptor de insulina IRS-1 e IRS-2 em resíduos de serina, resultando na inibição da via de sinalização da insulina. Esse evento contribui para o desenvolvimento da resistência à ação da insulina, comprometendo, por consequência, a capacidade de sinalização celular e a captação de glicose pelas células (SCHENK et al, 2008).

As moléculas de adesão solúveis, como a molécula de adesão intracelular solúvel (sICAM-1), a molécula de adesão vascular celular solúvel (sVCAM-1) e E-selectina encontram-se elevadas em indivíduos com disfunção metabólica (RUBIO-GUERRA *et al.*, 2009). Além disso, constata-se aumento da expressão de sVCAM-1, sICAM-1 e E-selectina posteriormente à ingestão de uma refeição com alto teor de lipídios, indicando um quadro de estresse endotelial (DEROSA, 2009). As moléculas de adesão auxiliam na aderência à parede endotelial e na posterior transmigração de leucócitos a partir da circulação sanguínea para os tecidos, esse mecanismo está diretamente envolvido com eventos ateroscleróticos (STEFANADI *et al.*, 2010).

Embora o padrão de dieta ocidental esteja relacionado com o desenvolvimento do processo inflamatório e conseqüentemente com o surgimento de DCNT (O'KEEFE *et al.*, 2008), a ingestão de uma dieta saudável rica em frutas e hortaliças é essencial para a prevenção de DCNT (KIMOKOTI; MILLEN, *et al.*, 2016; SLAVIN; LLOYD *et al.*, 2012).

Um estudo epidemiológico mostrou associação positiva entre a ingestão de alimentos processados ricos em ácidos graxos trans e as concentrações de biomarcadores inflamatórios plasmáticos, incluindo a IL-6 e a proteína C reativa (PCR) (LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2005). A PCR é uma proteína de fase aguda positiva sintetizada, principalmente, pelo fígado em resposta à elevada concentração de IL-6 circulante, sendo o seu aumento preditor para o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 e de doenças cardiovasculares (GALLAND, 2010). Outro importante marcador inflamatório de fase aguda é a proteína sérica amilóide A (SAA), que tem sua expressão induzida por estímulos pró-inflamatórios como a IL-1 $\beta$ , a IL-6 e o TNF- $\alpha$  (ZHAO *et al.*, 2010).

### **1.3 Migração leucocitária**

O processo de migração tem início no sistema circulatório, onde os leucócitos estabelecem conexões com o endotélio das vênulas pós-capilares. Essa ligação é temporária e é mediada por moléculas de adesão pertencentes à família das selectinas. Por exemplo, a L-selectina (CD62L), constantemente expressa nos neutrófilos, desempenha um papel nesse processo. Um de seus ligantes endoteliais é uma forma fucosilada variante do CD34, um receptor presente nos linfócitos, com o qual a L-selectina interage (WAGNER *et al.*, 2000).

O tráfego é mediado por receptores-mediadores de adesão das células sanguíneas e de células endoteliais dos vasos sanguíneos. A transição envolve as

seguintes etapas: amarração inicial, adesão “rolante” transitória e adesão firme. A adesão firme é geralmente seguida por mudanças morfológicas e migração transendotelial para o estromado tecido, de modo que a célula possa realizar sua função pretendida dentro do tecido (CHANG, 2000).

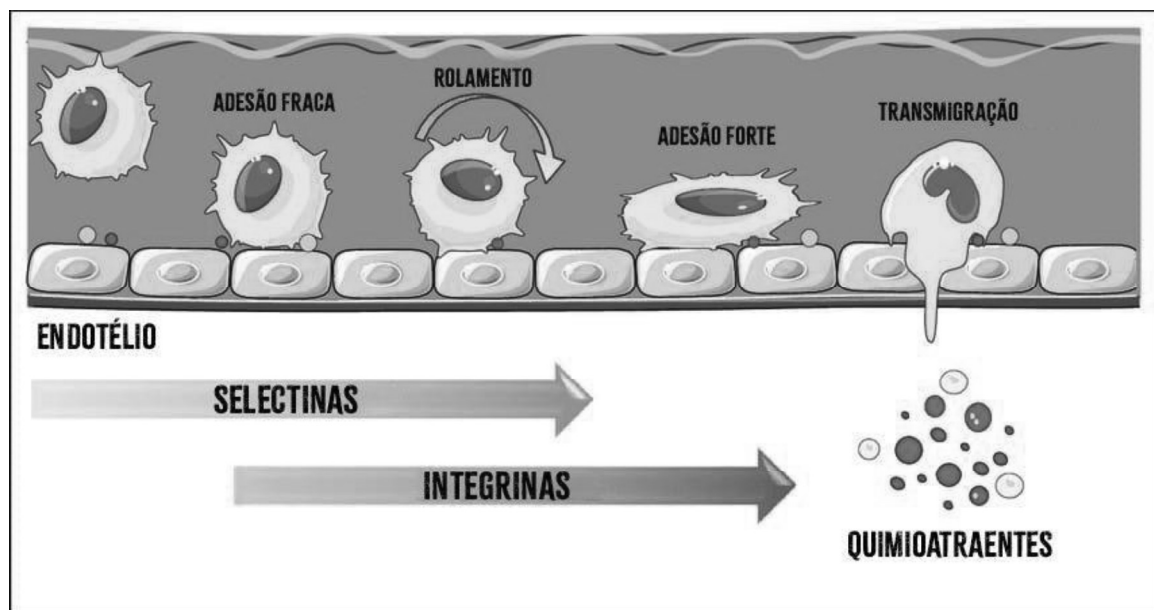
As selectinas são responsáveis por promover uma adesão transitória dos leucócitos à superfície do endotélio, o que resulta em um movimento de "rolamento" das células. Essa interação adesiva é o primeiro passo para ações mais robustas, incluindo a adesão firme entre os leucócitos e o endotélio. Essa etapa mais estável é mediada pelas integrinas, permitindo que os leucócitos se fixem adequadamente ao endotélio vascular antes de migrarem para os tecidos específicos onde são necessários (KUBES, 2002; SCHURMANN, *et al.* 1995; KUBES *et al.*, 2002).

A adesão firme das células é facilitada pela interação entre as integrinas leucocitárias (CD11/CD18) e as moléculas da família das imunoglobulinas, como VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) e ICAM-1 e ICAM-2 (*intercellular adhesion molecule*), presentes no endotélio. Essas moléculas são responsáveis por garantir a aderência firme dos leucócitos, que ocorre por meio do engajamento com as integrinas leucocitárias (CD11/CD18). Inicialmente, as integrinas geralmente exibem uma capacidade de aderência relativamente baixa. Contudo, quando quimiocinas como a IL-8, MIP-2 (*macrophage-inflammatory protein 2*) e KC (*keratinocyte-derived chemokine*) se ligam aos proteoglicanos na superfície das células endoteliais, ocorre um aumento na expressão das integrinas e uma mudança em sua conformação nos leucócitos em processo de rolamento. Essas mudanças resultam em um aumento na habilidade adesiva dos leucócitos. Devido a essas alterações, o movimento de rolamento dos leucócitos é interrompido, levando-os a aderir de forma firme ao endotélio vascular (HUTTENLOCHER *et al.*, 1995; KUBES, 2002). Nesta fase subsequente de adesão firme, ocorre o processo de diapedese ou transmigração, durante o qual os leucócitos ultrapassam a parede endotelial (Figura 1). Esse mecanismo é essencial para permitir que os leucócitos alcancem os tecidos-alvo, onde desempenham suas funções imunológicas.

A diapedese e a adesão dos leucócitos são fortemente influenciadas por mediadores inflamatórios, que podem deflagrar uma cascata de eventos capaz de liberar outros fatores estimulantes. No processo de quimiotaxia, substâncias químicas sinalizadoras ou agentes quimiotáticos se conectam a receptores específicos presentes nas proteínas G das células leucocitárias. Esse engajamento provoca a ativação da via

de sinalização chamada fosfoinositol-3 quinase (PI3K). Tais mudanças culminam no aumento dos níveis de cálcio no interior da célula (cálcio citosólico) e na ativação das guanosinas trifosfatases (GTPases). Como resultado, são formadas projeções semelhantes a pseudópodes, e os leucócitos são impulsionados a se moverem. Adicionalmente, os agentes quimiotáticos também estimulam a ativação dos leucócitos, resultando em um incremento na expressão de moléculas de adesão e em uma maior exposição das integrinas (FRANCISCHETTI, 2010).

A capacidade das vias de sinalização intracelular de induzir mudanças na conformação e afinidade da integrina foi denominado “sinalização de dentro pra fora” para contrastar com a “sinalização de fora pra dentro” que ocorre quando o ligante se liga ao domínio extracelular e inicia os sinais intracelulares. A ligação do talino à cauda citoplasmática da integrina  $\beta$  é uma etapa final crítica no processo de ativação da integrina (LAGARRIGUE, 2016).



**Figura 1:** Esquema de transmigração de leucócitos através do endotélio. Fonte: Adaptado de MUSIAL-WYSOCKA, *et al.*, 2019.

#### 1.4 Suco de uva e antocianinas

Frutas e vegetais fornecem micronutrientes, minerais, fibras e vitaminas, mas também compostos fitoquímicos, entre os quais metabólitos secundários de natureza fenólica, como as antocianinas, que se destacam pela atividade antioxidante. As mais de 600 antocianinas conhecidas, são distribuídas em inúmeras espécies de alimentos e são

responsáveis pela coloração vermelha, azul e púrpura (MARTIN *et al*, 2017).

Malacrida (2003) conduziu um estudo para determinar a concentração de antocianinas em sucos de uva, tanto os reconstituídos como os simples, que estão disponíveis comercialmente. Os resultados revelaram que os sucos de uva simples apresentaram uma média de concentração de antocianinas maior (28,7 mg/L) em comparação com os sucos reconstituídos (17,3 mg/L). É importante notar que as diferenças no processamento dos sucos podem ter contribuído para as distintas quantidades de antocianinas encontradas, visto que os sucos reconstituídos são produzidos a partir da diluição do suco concentrado de uva.

Dentro do âmbito da enologia, os compostos fenólicos assumem um papel de suma importância, exercendo uma influência crucial na qualidade sensorial dos vinhos. Eles desempenham uma função fundamental na conferência de cor, corpo e adstringência aos vinhos, o que contribui para diferenciar as características entre vinhos tintos e brancos, com a presença ou ausência de antocianinas sendo um fator determinante. A significativa influência desses compostos fenólicos nas propriedades sensoriais dos vinhos é evidente. Tanto as uvas quanto os próprios vinhos apresentam uma gama diversificada de compostos fenólicos, originados de uma estrutura básica. No entanto, é importante notar que as concentrações totais desses compostos são mais substanciais nas uvas em comparação aos vinhos, conforme explorado por Cabrita e colaboradores (2003).

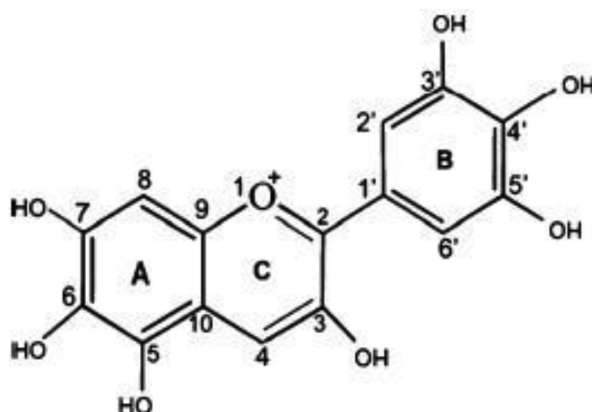
As concentrações de compostos fenólicos totais e antocianinas presentes nas uvas podem apresentar variações consideráveis, o que está sujeito a diversos fatores distintos. Esses fatores englobam a espécie e variedade da uva, seu estágio de maturação, as condições climáticas em que crescem e a cultivar específica. Além disso, intervenções realizadas durante o processo de produção do suco têm um impacto notável na quantidade desses compostos presentes no suco final. Dentre essas intervenções, destacam-se a técnica de extração utilizada, a duração do contato entre o suco e as partes sólidas da uva, como casca e sementes, as etapas de prensagem, os procedimentos térmicos empregados e a aplicação de tratamentos enzimáticos. Cada uma dessas ações pode influenciar significativamente a quantidade de compostos fenólicos presentes no suco final (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

As antocianinas pertencem à ampla classe dos flavonoides que estão presentes em uma ampla variedade de frutas, vegetais e bebidas, incluindo vinho, chá e extrato de mirtilo. Delfinidina é um tipo de polifenol pertencente ao grupo das antocianinas que influenciam na função do endotélio e exercem efeito inibitório sobre a lesão oxidativa



de células endoteliais. A delphinidina apresenta estrutura química de 6 grupos hidroxila. Estudos anteriores mostraram que a delphinidina pode efetivamente proteger células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs) contra o estresse oxidativo induzido por ox-LDL (LDLc oxidada) através da diminuição da concentração de EROs (Espécies Reativas de oxigênio) intracelular, suprimindo a produção de peroxidação lipídica, restaurando as atividades de antioxidantes endógenos e aumentando o nível de óxido nítrico (CHEN, *et al*, 2011).

Segundo estudo de Ferrari *et al* (2017), as antocianinas são o grupo de flavonoides mais importantes para a promoção da saúde e estão amplamente distribuídos na dieta humana, com ingestão diária entre 5 e 215 mg. A biodisponibilidade das antocianinas é menor do que os outros flavonoides. No entanto, mais de 70% das antocianinas presentes em frutas podem atingir o cólon e assim assumir sua atividade anti-inflamatória através da modulação de várias citocinas como IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , NFkB e COX-2.



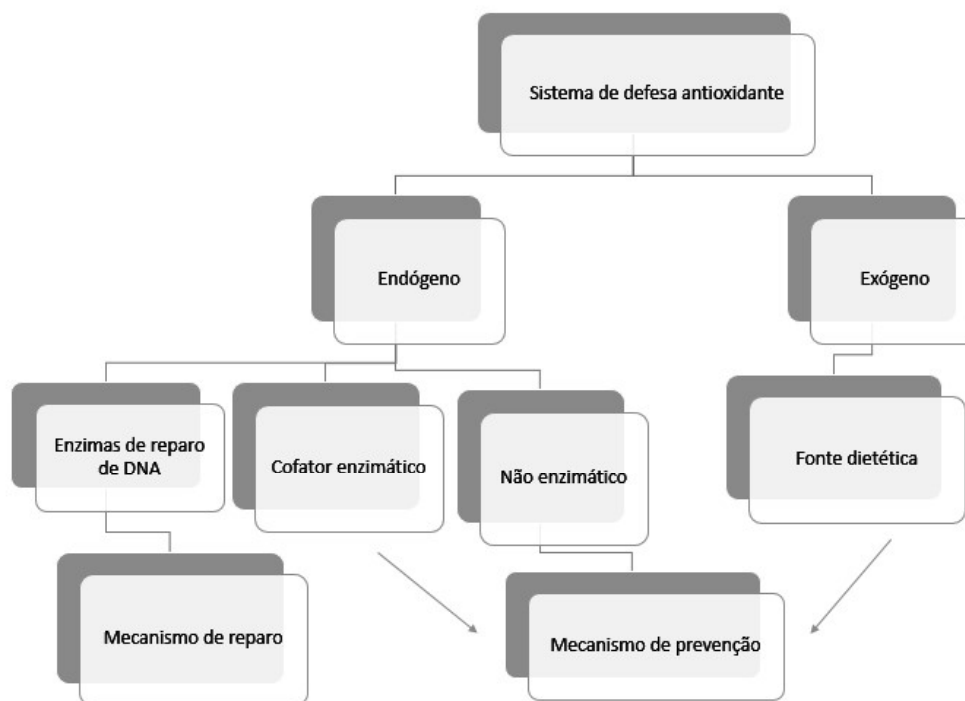
**Figura 2:** Estrutura química da delphinidina. Fonte: CHEN *et al.*, 2011.

Atualmente, o estresse oxidativo tem sido cada vez mais estudado como uma das possíveis causas de muitas doenças e do próprio fenômeno do envelhecimento, sendo que a produção excessiva de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) pode iniciar o processo de oxidação das LDLs. As antocianinas se comportam como antioxidantes atuando na captação direta de EROs, inibição de enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido, quelação de metais e prevenção do processo de peroxidação (MARTIN *et al*, 2017).

Nos dias de hoje, o estresse oxidativo vem ganhando uma atenção crescente como uma das possíveis causas de várias doenças e do próprio processo de envelhecimento. Nesse contexto, a produção excessiva de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) pode desencadear o processo de oxidação das LDLs, contribuindo para problemas de saúde.

As antocianinas, por sua vez, desempenham um papel importante como antioxidantes, atuando de diversas maneiras para combater o estresse oxidativo. Elas são capazes de capturar diretamente as EROs, inibir enzimas envolvidas na produção do ânion superóxido, realizar a quelação de metais prejudiciais e prevenir o processo de peroxidação (MARTIN *et al.*, 2017).

De acordo com estudos, estima-se que a população consuma aproximadamente 200 mg/dia de antocianinas, embora não exista uma recomendação específica estabelecida. A avaliação da capacidade antioxidante das antocianinas revelou uma atividade de 2 a 3 vezes maior do que outros antioxidantes conhecidos, como a catequina, a vitamina E e antioxidantes sintéticos (MARTIN *et al.*, 2017; STRINGHETA *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Resumo do sistema de defesa antioxidante. Fonte: Adaptado de MARTIN *et al.*, 2017.

Dados relacionados à biodisponibilidade da delphinidina ainda não são totalmente esclarecidos, contudo em estudo de Goszcz, 2017, foi avaliado que o principal produto de degradação da delphinidina é o ácido gálico, o qual compartilhou inúmeras características protetoras antioxidantes. Tanto a delphinidina quanto o ácido gálico induziram a um aumento no GSH (glutathiona peroxidase) intracelular total.

Considerando todo o exposto, os estudos com alimentos e compostos bioativos que apresentem um potencial relevante na atenuação do processo inflamatório envolvido

na metainflamação, é de grande interesse para a ciência da Nutrição, saúde humana e ciência dos alimentos. Mesmo com o apontamento de alguns estudos sobre as propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias da delphinidina (DAYOUB *et al.* 2017), pesquisas que avaliem a ingestão crônica de suco de uva integral e mecanismos sobre parâmetros da migração celular no processo inflamatório ainda não são amplamente explorados.

## **2. OBJETIVOS**

Investigar o efeito da ingestão de suco de uva integral sobre aspectos da inflamação e migração celular em mulheres com sobrepeso e a participação da delphinidina-3-glicosídeo na modulação de mecanismos da migração celular *in vitro*.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 ETAPA I (*in vivo*):**

#### **3.1.1 População do estudo**

O presente estudo é intervencional. A população do presente estudo é composta por mulheres com idade entre 18 e 40 anos, cujo índice de massa corporal (IMC) deverá estar entre 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup>, sendo assim, classificada como sobrepeso, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995). Esse trabalho é uma colaboração entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, tendo como colaborador o Prof. Marcelo Macedo Rogero. As participantes foram recrutadas por meio de cartazes distribuídos pelo campus e por meio de anúncios no seu jornal eletrônico ([www.jornal.usp.br](http://www.jornal.usp.br)). A coleta de sangue foi realizada no Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza (CSEGPS), o qual está localizado ao lado da Faculdade de Saúde Pública, na Avenida Dr. Arnaldo, 900.

Os indivíduos interessados foram convocados para uma entrevista, na qual responderam a um questionário contendo os critérios de inclusão e tiveram suas medidas antropométricas aferidas. Atendido a todos os critérios de inclusão, os interessados receberam instruções a respeito do delineamento do estudo, tendo esclarecido todo tipo de dúvida. Foi entregue duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

(ANEXO 1) que foram assinadas pelo candidato e pelo responsável da pesquisa, sendo uma delas pertencente ao participante. No final da entrevista, foram agendadas as datas para coleta de sangue, sendo tempo 0, tempo 14 dias e tempo 28 dias após o início do consumo do suco de uva. Além disso, as voluntárias foram orientadas a não praticarem nenhum tipo de exercício físico no período de 48 horas antecedentes às coletas e a não consumirem nenhum tipo de bebida alcoólica 1 semana antes.

### **3.1.2 Critérios de inclusão**

- Sexo feminino.
- 18 a 40 anos de idade.
- IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup>.
- Estar disposta a aderir ao protocolo de estudo.
- Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

### **3.1.3 Critérios de exclusão**

- Sexo masculino;
- Menores de 18 anos ou maiores de 40 anos;
- IMC menor que 25,0 kg/m<sup>2</sup> ou maior que 29,9 kg/m<sup>2</sup>;
- Ser atleta;
- Diagnóstico de diabetes melito;
- Fazer uso de medicação prescrita para controlar inflamação;
- Fazer uso de medicação prescrita para perfil lipídico plasmático (por exemplo, estatinas, fibratos (fenofibrato) e Omacor);
- Fazer uso de medicação prescrita para controlar a pressão arterial sistêmica (inibidores da ECA, bloqueadores do receptor de angiotensina 2, bloqueadores do canal de cálcio,  $\alpha$ -inibidores e diuréticos);
- Fazer uso de qualquer tipo de suplemento nutricional;
- Ter o hábito de consumo frequente de suco de uva e de suco de outra fruta;

- Ter ingerido álcool 7 dias antes do experimento;
- Ser tabagista;
- Possuir algum problema gastrointestinal crônico (por exemplo, doença inflamatória intestinal, doença celíaca, câncer);
- Estar gestante;
- Fazer uso de anticoncepcional hormonal;
- Estar participando de outro estudo;
- Ter praticado exercício físico 48 horas antes da realização do estudo.

### **3.1.4 Caracterização dos participantes**

Um questionário foi aplicado para confirmação dos critérios de inclusão e exclusão. As voluntárias foram pesadas em balança plataforma digital (precisão 100g) e a estatura aferida em estadiômetro (precisão 0,5 cm). Para as medidas a voluntária estava descalça, ereta e sem adornos e acessórios. As medidas foram realizadas em duplicata e o valor considerado foi a média. A partir dos dados foi calculado o índice de massa corporal (IMC) e classificado segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995). As circunferências da cintura (CC) e do quadril (CQ) foram medidas com o indivíduo ereto, braços relaxados ao lado do corpo, pés juntos, abdômen relaxado e a região medida livre de roupas. O ponto de medição utilizado para a CC foi o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e para a CQ a fita métrica foi colocada na região de maior protuberância, sem comprimir a pele. A pressão arterial foi aferida por aparelho digital da marca Omron, com o voluntário sentado e com o braço apoiado, sendo o resultado obtido pela média entre três medidas.

### **3.1.5 Delineamento do estudo**

No primeiro dia do protocolo do estudo, foram coletados 30 mL de sangue de cada voluntária. Neste mesmo dia, dados de consumo alimentar foram obtidos por meio de um questionário de frequência alimentar desenvolvido pelo grupo, e foram aferidas as medidas antropométricas (peso, estatura e circunferência da cintura), pressão arterial e glicemia capilar. Neste mesmo dia, a voluntária recebeu o número de garrafas correspondente ao consumo diário de 500 mL de suco de uva integral a ser ingerido

durante as 2 primeiras semanas.

Após 2 semanas de intervenção, uma nova coleta de sangue de cada voluntária foi realizada. No dia posterior ao consumo da última garrafa de suco para completar 1 mês 28 dias de intervenção, foi realizada a última coleta de sangue, aferida as medidas antropométricas e a voluntária respondeu novamente, ao questionário de frequência alimentar. Neste mesmo dia, a voluntária recebeu o número de garrafas correspondente ao consumo diário de 500 mL de suco de uva integral a ser ingerido durante as 2 últimas semanas. Segue abaixo o delineamento do estudo (Figura 4).

**Figura 4** - Delineamento do estudo.



Fonte: autor, 2021

### 3.1.6 Suco de uva integral

O suco de uva integral utilizado, foi baseado na análise de seus compostos fenólicos. Foram testadas seis marcas comerciais de suco de uva integral e a marca com maior quantidade de compostos fenólicos totais e perfil mais variado foi a escolhida. O suco de uva integral escolhido no estudo foi produzido e envasado na serra Gaúcha, a partir das espécies de uva Bordô, Concord, Isabel e Violeta. Um único lote de suco de uva integral, sem adição de água, açúcar e conservantes, foi adquirido e usado com todas as voluntárias do estudo.

O suco de uva teve sua capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH e ORAC de dois lotes do suco. Tal avaliação foi realizada no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade da Profa. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto.

De acordo com a tabela nutricional apresentada no produto, o suco apresenta a seguinte composição nutricional (tabela 1):

**Tabela 1-** Composição nutricional do suco de uva integral.

<b>Composição nutricional</b>	<b>Rótulo (100 mL)</b>	<b>Estudo (500 mL)</b>
Calorias (kcal)	73	365
Carboidratos (g)	17	85
Açúcares (g)	14,5	72,5

### **3.1.7 Análises bioquímicas e determinação da concentração sérica de biomarcadores inflamatórios**

Uma amostra do sangue foi coletada para a realização de dosagens bioquímicas. O sangue total foi coletado em tubo sem anticoagulante, após a coleta essa amostra foi centrifugada e o soro armazenado para posterior dosagem de: Triglicérides, Magnésio, Sódio, Potássio, Cálcio, Colesterol total, HDL, LDL, Proteína C reativa, Progesterona, D-dímero, Fibrinogênio, ALT, AST, Gama GT, Creatinina, Ureia, Amilase, por metodologia automatizada (Cobas 6000<sup>®</sup>- Roche Diagnostics).

As concentrações séricas de biomarcadores inflamatórios (IL-6, IL- 10, TNF- $\alpha$ , MCP-1) e a dosagem das moléculas solúveis de adesão (VCAM e ICAM) foram analisadas por kits comerciais (Merck Millipore), seguindo as recomendações do fabricante.

## **3.2 Sangue periférico**

### **3.2.1 Hemograma**

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA K3 e utilizadas para a realização do hemograma por metodologia automatizada (ABX <sup>®</sup> HORIBA). Valores diferenciais, quando necessários foram confirmados por microscopia em extensões sanguíneas coradas pela coloração de May Grunwald-Giensa modificada (ROSENFELD, 1947).

### **3.2.2 Citometria de Fluxo**

Para realização da quantificação das Integrinas CD11b e CD18 e dos leucócitos CD4 (BD 555347), CD8 (BD 555635) e CD14 (BD 555399) por citometria de fluxo, também foram utilizadas amostras sanguíneas coletadas com EDTA K3. As células foram incubadas com os respectivos anticorpos CD11b (Cat. 11-0112-82; eBioscience, San Diego, CA, USA) e CD18 (Cat. 555923; BD, Franklin Lakes, NJ, USA), após a incubação

prosseguimos com a lise das hemácias. A seguir as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão e foi adicionado 400 µL de Formaldeído a 1% e imediatamente realizou-se a aquisição no FACSCanto II (BectonDickson, NJ, USA) foram adquiridos 50.000 eventos. As amostras foram analisadas no programa FlowJo® (TreeStar, OR, USA).

### 3.2.3 Separação das células polimorfonucleares

Uma alíquota da amostra sanguínea foi destinada para a obtenção de células polimorfonucleares. Para essa etapa utilizamos gradiente de densidade para separação das células polimorfonucleares do sangue das voluntárias.

Brevemente, o sangue foi centrifugado, o plasma removido e armazenado, o sangue ressuspenso em PBS e posteriormente adicionado a um gradiente previamente preparado de solução de Percoll 60% e solução de Percoll 70%. Após a centrifugação, as células polimorfonucleares foram obtidas. Essas células passaram por dois processos de lavagem com PBS para retirada do reagente Percoll®. Após a lavagem, uma alíquota das células foi utilizada para extração de RNA.

### 3.2.4 rtPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

Para a realização do rtPCR, inicialmente o RNA total das células neutrofilicas periféricas, obtidas como descrito anteriormente, foi extraído utilizando-se o Kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Incorporated, Chatsworth, EUA), sendo em seguida mensurado sua quantidade e pureza utilizando-se o equipamento *NanoVue Plus* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A pureza do RNA total foi avaliada pela razão de absorvância  $A_{260nm}/A_{280nm}$  (SAMBROOK, 2001). O DNA complementar (cDNA) das amostras foi sintetizado a partir de 32 µg/µl de RNA total em um volume total de 10 µl em água livre de DNase e RNase utilizando-se o kit *High Capacity DNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi feita sob as seguintes condições de ciclagem: incubação dos reagentes por 10 minutos a 25° C, aquecimento a 37° C por 120 minutos e 85° C por 5 minutos e resfriamento a 4° C, seguindo as instruções do fabricante.

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa, no qual foi utilizado um gene de referência como controle endógeno. Neste intuito, foram testados 3 genes: GAPDH (Cat.Hs03929097\_g1), RN18S (Cat.HS03928990\_g1)



e  $\beta$ - actina (Cat.Hs99999903\_m1). Os resultados foram avaliados pelo programa *geNorm*<sup>TM</sup>, sendo que o gene RN18S apresentou a estabilidade mais adequada para normalização dos valores de expressão gênica.

Os genes de interesse foram selecionados de acordo com pesquisas bibliográficas, sendo eles: TNF- $\alpha$  (Cat.Hs00174128\_m1), IL-1 $\beta$  (Cat.Hs01555410\_m1), IL-8 (Cat.Hs00174103\_m1), NOS (Cat.Hs00167223\_m1), NFkB (Cat.Hs00765730\_m1), NFkBia (Cat.Hs00153283\_m1), CD18 (Cat.Hs00164957\_m1). A determinação da expressão dos genes foi feita por PCR em tempo real utilizando o sistema *Taqman*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e os ensaios foram conduzidos no equipamento *A & B StepOne Plus Real-Time PCR System*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). As condições de ciclagem foram: pré- incubação por 2 minutos a 50° C e por 20 segundos a 95° C para desnaturação das duplas-fitas de cDNA, seguido de 40 ciclos de 1 segundo a 95° C e 20 segundos a 60° C.

Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ct, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de expressão relativa} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

O  $\Delta\text{Ct}$  foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos.

### **3.3 ETAPA II (*in vitro*)**

#### **3.3.1 Análise *in vitro***

Foram utilizadas as células de linhagem C1498 (ATTCC<sup>®</sup> TIB-49<sup>TM</sup>) para avaliar os efeitos da delfinidina-3-glicosídeo em parâmetros inflamatórios e na migração celular. Para o etapa *in vitro* foi utilizada a delfinidina 3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (Sigma-Aldrich- 73705 Lot# BCBZ6689).

As células foram devidamente cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% e mantidas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO<sub>2</sub> á 37°C. Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células/poço em placas contendo 12 poços e expostas por 24 horas a delfinidina-3-glicosídeo em diferentes concentrações, com 1.25  $\mu\text{g/mL}$  de LPS ou sem LPS. Para escolha da dose de delfinidina-3-glicosídeo, foi inicialmente realizada uma

curva dose resposta nas concentrações de 3, 6, 12, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  (QIN *et al.*, 2009) e avaliada proliferação e ciclo celular e apoptose.

### **3.3.2 Ensaio de citotoxicidade celular**

Para avaliar a citotoxicidade celular, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), seguindo a literatura (MOSMANN, 1983). Após 24 horas de exposição das células as diferentes concentrações de delfinidina-3-glicosídeo (0, 3, 6, 12, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$ ) e estimuladas ou não com 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS, o meio de cultura foi aspirado. Adicionou-se 100 $\mu\text{L}$  da solução de MTT (5mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) por poço da placa e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. Posteriormente, a solução de MTT foi aspirada e 100 $\mu\text{L}$  de isopropanol foram adicionados por poço para a dissolução dos cristais de formazan. Finalmente, as placas foram incubadas *overnight*, em temperatura ambiente, e a absorbância dos cristais de formazan dissolvidos em isopropanol foram medidas à 570 nm. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek<sup>®</sup> Instrumentals, Winooski, EUA).

### **3.3.3 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo**

A avaliação da apoptose das células foi realizado após cultivo com diferentes concentrações de delfinidina-3-glicosídeo e estimuladas ou não com 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS, foi realizada pela marcação das células com Anexina V- FITC e Iodeto de Propídio (PI). As células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço/mL e cultivadas 24h em atmosfera umidificada a 95%, 5% de  $\text{CO}_2$  à 37°C. Após 24 horas as células foram removidas centrifugadas e adicionados e no *pellet* 50  $\mu\text{L}$  de tampão de Anexina V, 3  $\mu\text{L}$  de Anexina V-FITC (PharmingenBecton Dickinson) e 8  $\mu\text{L}$  de PI (Invitrogen – Molecular Probes). As células ficaram incubadas durante 20 min protegidas da luz. A aquisição de dados foi realizada por citometria de fluxo (FACScan<sup>®</sup>, Becton Dickson, San Jose, EUA). A análise foi realizada de acordo com a % de células marcadas, com Anexina V-FITC e o PI sendo para um, ou para ambos os marcadores analisados no programa FlowJo<sup>®</sup> (Tree Star, Inc, EUA) (RIEGER *et al.*, 2011).

### **3.3.4 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo**

Para a avaliação do ciclo das células após cultivo com diferentes concentrações de delfinidina-3-glicosídeo foram preparadas placas de 12 wells com  $1 \times 10^6$  células/well.

As células da placa foram expostas 24 horas a diferentes concentrações de delfinidina-3-glicosídeo e estimuladas ou não com 1.25 µg/mL de LPS e mantidas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

Após 24 horas, as células foram coletadas e lavadas com uma vez com PBS (x 300g) e ressuspensas em 50 µl de PBS e 200µl de etanol 70% e mantidas no gelo por 20 minutos, após esse período os tubos foram centrifugados e o sobrenadante desprezado. Ao pellet foi adicionado 2,5µl de RNase por 30 minutos a 37° C. Em seguida foi adicionado aos tubos 4µl de iodeto de propídeo (30 minutos) e as amostras analisadas em citometria de fluxo, com a quantificação da porcentagem das regiões G0/G1 e S/G2/M, utilizando os o programa FlowJo<sup>®</sup> (TreeStar).

### **3.3.5 Dosagem de citocinas**

Uma vez definida a dose de delfinidina-3-glicosídeo, células C1498 foram cultivadas em DMEM alta glicose 10%, durante 24h na presença de delfinidina-3-glicosídeo e estimuladas com 1.25 µg/mL de LPS. A análise quantitativa das citocinas pró e anti-inflamatórias IL-1β, IL-6, IL-8, CCL2, no sobrenadante das células cultivadas foi realizada pelo método de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) – kits R&D Systems, seguindo-se as recomendações do fabricante.

### **3.3.6 Western blot NFκB total e fosforilado**

Como descrito anteriormente, as células foram lavadas e lisadas com tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 100 µg/ml PMSF, 0,5 mM EDTA). Após as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi quantificado e um volume correspondente a 200µg foi misturado ao tampão de amostra (3 x concentrado, 100 mM Tris.HCL, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol) e denaturadas (10 min a 100°C). A corrida eletrofrética foi realizada em gel de poliacrilamida seguindo-se protocolo de SAMBROOK *et al.*, (1989) e HARLOW & LANE (1988). Após as proteínas separadas no gel foram transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose por 2 horas a 120V e as mebranas bloqueadas em solução (leite desnatado 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) por 2 horas.

As membranas foram incubadas com anticorpos específicos (Santa Cruz

Biotechnology) , NF- $\kappa$ B (sc-372), pNF- $\kappa$ B (sc-33039) na diluição 1:1000 e  $\beta$ -actina (concentração 3:10000, SIGMA A3856-200UL), por 4 horas, à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por 30 minutos PBS. Após a lavagem as membranas foram incubadas com anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase e, em seguida, incubadas com solução contendo reagentes de quimioluminescência (Kit ECL system<sup>®</sup>; Amersham Biosciences), e as imagens foram avaliadas utilizando o equipamento de Imagem ImageQuant 400 (GE Helthcare). A determinação da expressão das proteínas foi normalizada por quantificação de  $\beta$ -actina.

### **3.3.7 Citometria de Fluxo**

Para realização da quantificação das Integrinas CD11b e CD18 nas células C1498, estas foram cultivadas em DMEM alta glicose 10%, durante 24h na presença de delfinidina-3-glicosídeo e estimuladas ou não com 1.25  $\mu$ g/mL de LPS. As amostras foram processadas como já descrito no item 3.3.2. Nessa etapa foram utilizados os anticorpos os respectivos anticorpos CD11b (FITC; BD553310) e CD18 (PE; BD562828). As amostras foram analisadas no programa FlowJo<sup>®</sup> (TreeStar).

### **3.3.8 Ensaio de migração de células C1498**

Para avaliar os efeitos da delfinidina sobre a migração de células C1498, foram cultivadas  $1 \times 10^6$  células C1498 em placas de 24 poços contendo poços tipo *transwell* de 12 mm de diâmetro e poro de 8  $\mu$ m (Product number 353097, Corning, New York, NY, USA). Na camada superior do *transwell*, foi adicionado a quantidade de células mencionada em 300  $\mu$ L de meio DMEM sem suplementação com soro bovino fetal. A câmara intermediária foi composta por 300  $\mu$ L de meio DMEM + 0,1  $\mu$ M do agente quimioatático fMLP (N-formil-Metionil-Leucyl-Phenylalanine) (controle fMLP) e na câmara inferior foram adicionados 300  $\mu$ L de meio com 50  $\mu$ M de delfinidina sem SBF (soro bovino fetal) (controle negativo). A última camada continha 300  $\mu$ L de meio com 50  $\mu$ M de delfinidina + 0,1  $\mu$ M de fMLP. Após 6 horas de incubação foi avaliado e quantificado em câmara de Neubauer, por microscopia optica a taxa de migração celular.

### **3.3.9 rtPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)**

O RNA total foi obtido das células C1498 após cultivo como descrito no item 3.3.5, seguindo-se os precedimentos para extração do RNA e relização do DNA

complementar (cDNA) como descrito no item 3.2.5 e a análise da expressão gênica feita pelo método de quantificação relativa. A metodologia de quantificação foi realizada como descrito no item 3.2.6, incluindo a análise dos seguintes genes de interesse para a etapa *in vitro*: IL-1 $\beta$  (R&D DY401), IL-10 (R&D DY417), IL-6 (R&D DY406), NOS2 (Mm004440502\_m1), STAT-3 (Mm01219775\_m1), AKT-1 (Mm01331626\_m1), NFkB2 (Mm00479807\_m1), ICAM-1 (Mm00516023\_m1), PECAM-1 (Mm01242584\_m1) e o gene endógeno 18S (Mm03928990\_g1).

### 3.3.10 Análise estatística

Os dados foram primeiramente submetidos a testes de normalidade aplicando o teste Kolmogorov-Smimov e classificados em paramétricos e não paramétricos. Os resultados obtidos estão apresentados em média e desvio padrão quando classificados em paramétricos e em mediana e percentil quando classificados como não paramétricos. Inicialmente, os dois tempos (2 e 3) foram avaliados em relação ao momento *baseline* (tempo 1) por meio do teste ANOVA com pós-teste de múltipla comparação de Holm-Sidak quando forem classificados como paramétricos e pelo teste de Friedman e pós-teste de múltiplas comparações de Dunn quando classificados como não paramétricos. Os resultados obtidos *in vitro* foram utilizadas ANOVA com pós-teste de Tukey para definição da dose e nas demais análises foram utilizadas ANOVA de duas vias com pos teste de Tukey. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS *IN VIVO*

### 4.1 Avaliação da Composição do Suco de Uva

**Tabela 2-** Concentração de antocianinas no suco de uva integral.

Composto	mg/ 100 mL de suco
Delfinidina-3-glicosídeo	8,48
Malvidina-3-glicosídeo	2,32
Petunidina-3-glicosídeo	1,91
Cianidina-3-glicosídeo	1,46
Peonidina-3-glicosídeo	1,02

Valores expressos em mg/100 mL de suco

Conforme descrito no item 3.1.6, a caracterização dos compostos bioativos presentes no suco de uva foi realizada pelo Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. De acordo com a análise do conteúdo de antocianinas do lote de suco utilizado no estudo, a delphinidina-3-glicosídeo apresentou concentração quase 4 vezes maior em relação a segunda antocianina mais prevalente no suco (malvidina-3-glicosídeo) (tabela 2).

## **4.2 Dados do estudo**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, número do CAAE 69382117.6.0000.5421.

Foram recrutadas no estudo 20 voluntárias que se encaixaram nos critérios de inclusão. Ao longo do estudo ocorreram algumas exclusões de participantes por motivos de: alergia (n=1), gestação durante o estudo (n=1), anemia (n=1), não adesão ao protocolo (n=3), uso de anti-inflamatório esteroidal (n=1) e não comparecimento em todos os tempos do estudo (n=4).

## **4.3 Antropometria**

### **4.3.1 Peso e Índice de massa corporal (IMC)**

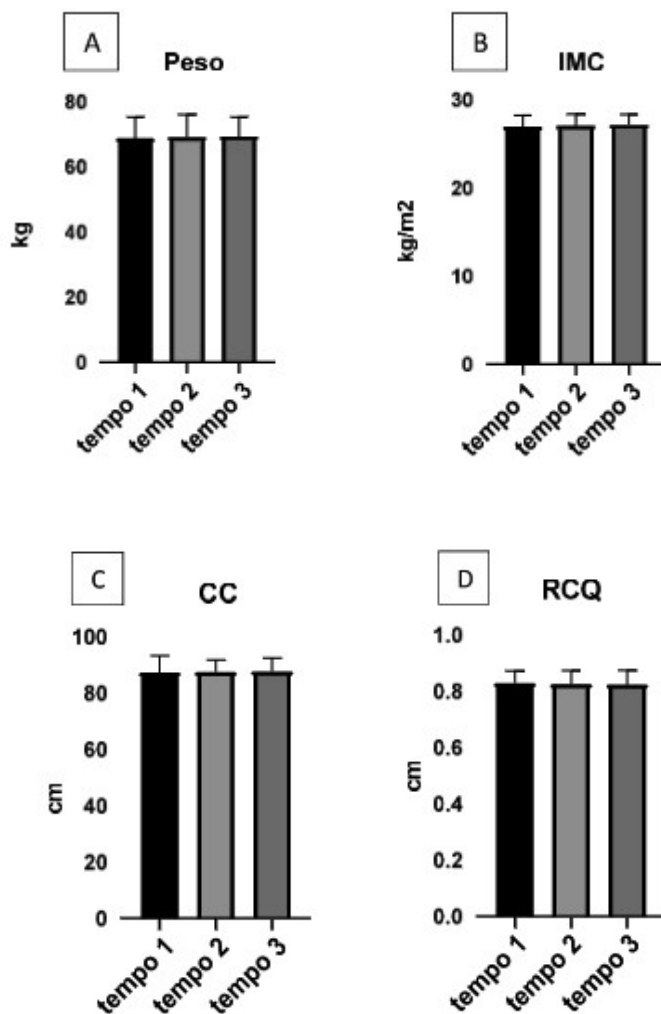
Para definição do estado nutricional das participantes, foi calculado o IMC nos 3 tempos do estudo (tempo 1 = baseline, tempo 2= após 14 dias da intervenção com suco de uva, tempo 3 = após 28 dias da intervenção com suco de uva). Todas as participantes iniciaram o estudo enquadradas na classificação de sobrepeso (média de IMC = 26,9 kg/m<sup>2</sup>). Ao final do estudo, após as 3 intervenções, todas as participantes mantiveram-sena classificação de sobrepeso, com média de IMC 27,1 kg/m<sup>2</sup> no tempo 3. O peso médio no tempo baseline (tempo 1) foi 68,7 kg, no tempo 2 foi de 69,2 kg e no tempo 3 foi de 69,3 kg (figura 4).

### **4.3.2 Circunferência da cintura (CC) e relação cintura quadril (RCQ)**

Por serem indicadores confiáveis de risco de doenças cardiovasculares, a circunferência da cintura e a RCQ foram medidas para avaliar o acúmulo de gordura abdominal. De acordo com as Diretrizes Brasileiras de Obesidade (2016), os valores de referência para CC e RCQ para mulheres são 0,80 cm e 88 cm, respectivamente.

O valor médio da CC no tempo 1 do estudo foi de 87,2 cm, no tempo 2 foi de

87,5cm e no tempo 3 foi de 87,6 cm (figura 5C). Já o valor médio da RCQ da população estudada no tempo 1 foi de 0,83 cm e de 0,82 cm ao final do estudo (tempo 3) (figura 5D). Não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros antropométricos estudados entre os três tempos do estudo.



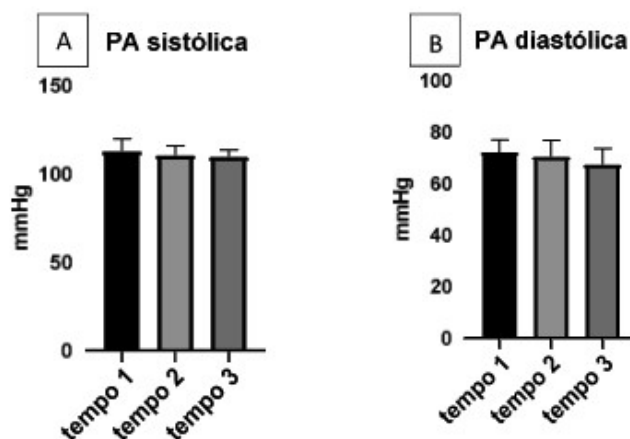
**Figura 5** – Resultados antropométricos (n=9) expressos em média  $\pm$  desvio padrão do (A) peso, (B) índice de massa corpórea, IMC, (C) Circunferência da cintura, CC e (D) relação cintura quadril, RCQ das mulheres (n=9) nos diferentes tempos estudados. *n* representa o número de mulheres avaliadas.

### 4.3.3 Avaliação física

Como parâmetro para avaliação física das participantes com sobrepeso, foi aferida a pressão arterial nos 3 tempos do estudo. Os valores de pressão arterial (PA) sistólica e diastólica considerados normais são  $\leq 120$  mmHg e  $\leq 80$  mmHg.

respectivamente.

Os valores médios da PA sistólica e diastólica das participantes no tempo 1 do estudo foram 112,5 mmHg x 72,1 mmHg (figuras 6A e 6B), estando dentro da classificação de normalidade. Já no último tempo do estudo (tempo 3), os valores médios da PA sistólica e diastólica foram de 109,4 mmHg x 67,2 mmHg (figuras 6A e 6B), mantendo-se dentro dos padrões de normalidade.

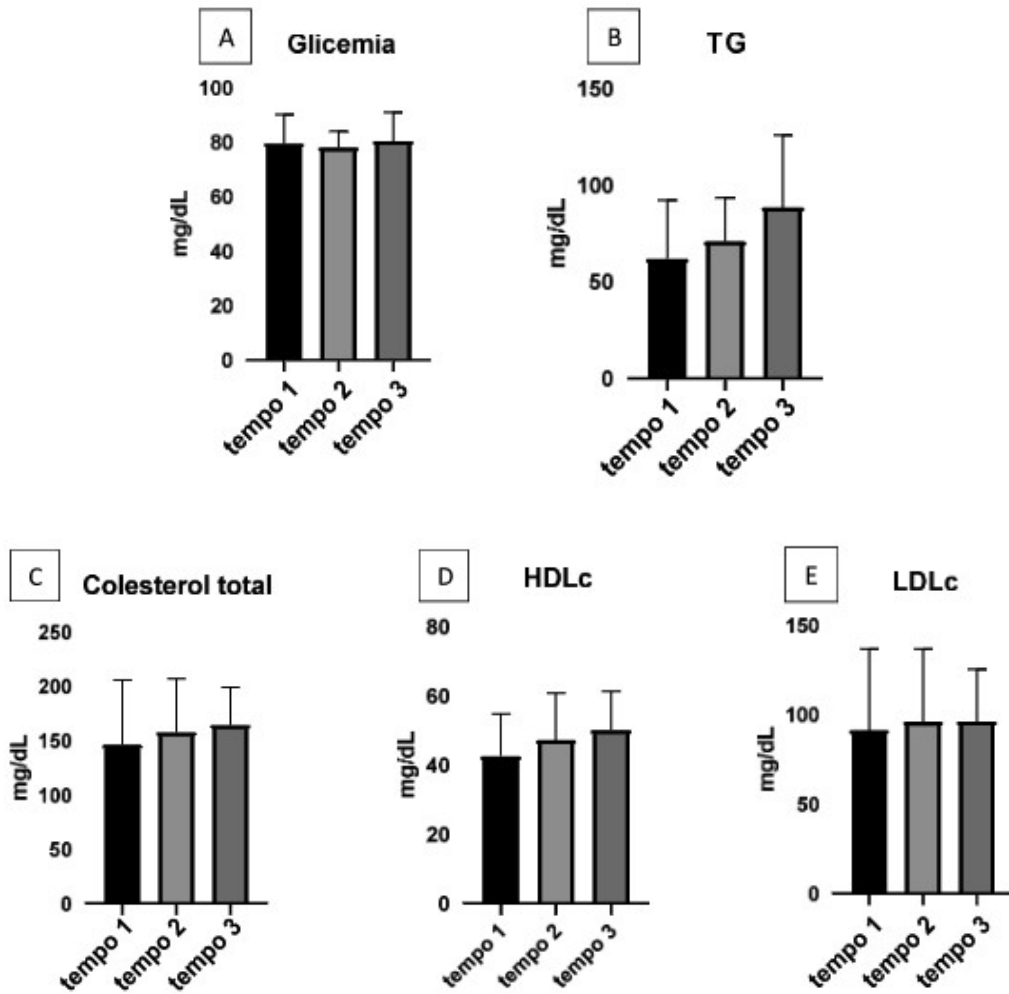


**Figura 6** – Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da (A) Pressão arterial sistólica (PA sistólica) e (B) Pressão arterial diastólica (PA diastólica) das mulheres ( $n=9$ ) nos diferentes tempos estudados.  $n$  representa o número de mulheres avaliadas.

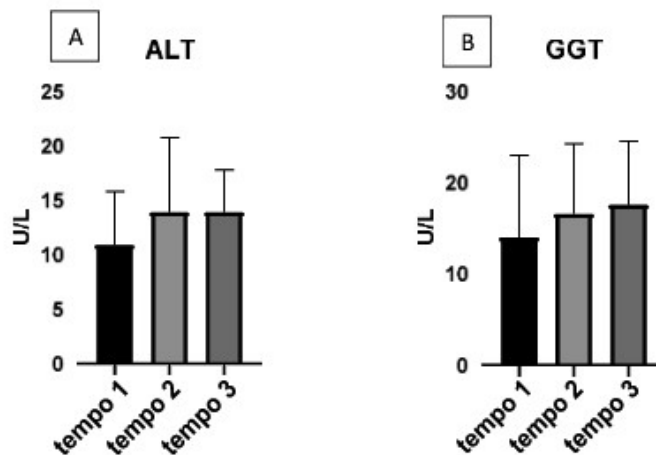
#### 4.3.4 Avaliação bioquímica

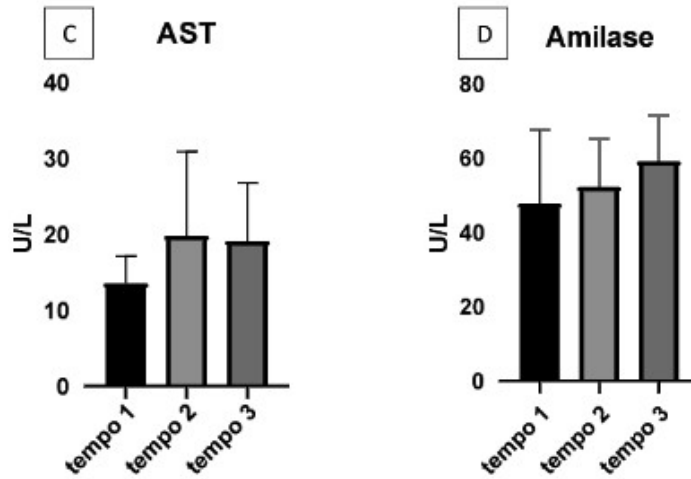
Os padrões bioquímicos referentes a glicemia e gorduras séricas (triglicerídeos – TG, colesterol total, lipoproteína de alta densidade – HDL e lipoproteína de baixa densidade – LDL) foram avaliados nos 3 tempos do estudo, conforme figura 7. Padrões hepáticos e pancreáticos (alanina aminotransferase – ALT, aspartato aminotransferase – AST, gama glutamil transferase – GGT e amilase) também foram avaliados nos tempos 1, 2 e 3 (figura 8). Os padrões de funcionamento renal, Uréia e Creatinina, foram avaliados nos tempos 1, 2 e 3 do estudo (figura 9). Proteína C reativa – PCR, Progesterona, D-dímero e Fibrinogênio também foram avaliados nos 3 tempos do estudo (figura 10) e em todos esses parâmetros não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados.



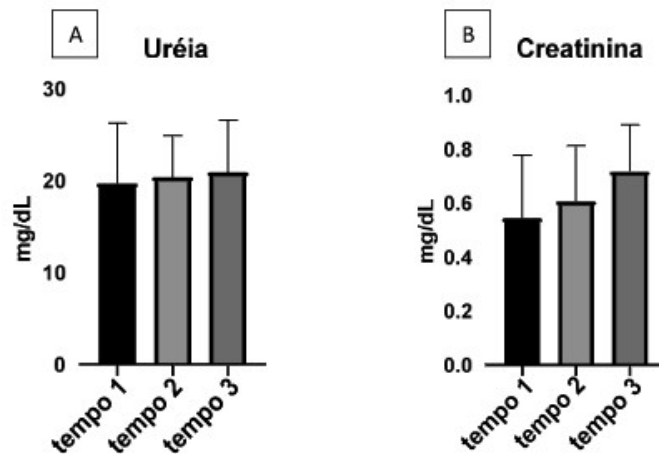


**Figura 7-** Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de glicemia (A); triglicerídeos (TG) (B), colesterol total, (C); Lipoproteína de alta densidade (HDL) (D); Lipoproteína de baixa densidade (LDL) (E) das mulheres (n=9) nos diferentes tempos estudados. *n* representa o número de mulheres avaliadas.

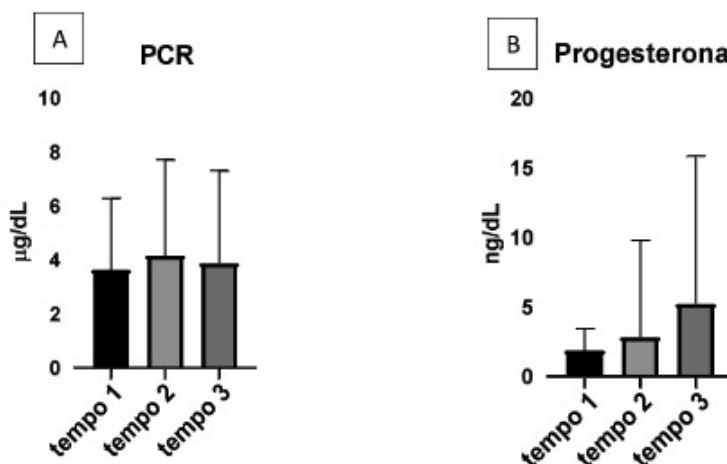


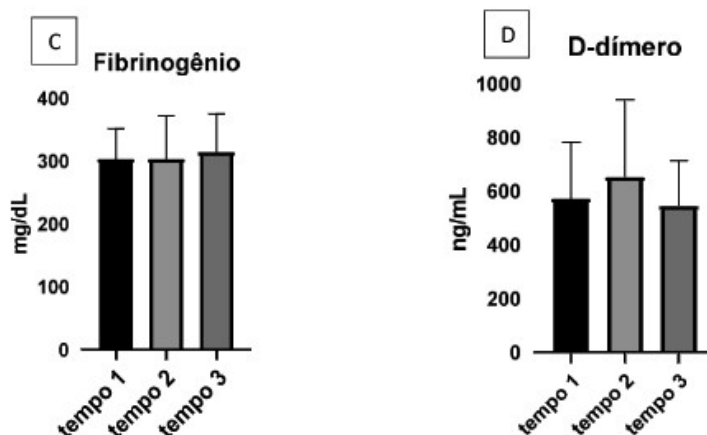


**Figura 8-** Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de Alanina aminotransferase (ALT) (A); Gama glutamiltransferase (GGT) (B); Aspartato aminotransferase (AST) (C) e Amilase (D) das mulheres ( $n=9$ ) nos diferentes tempos estudados.  $n$  representa o número de mulheres avaliadas.



**Figura 9 -** Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de Uréia (A) e Creatinina (B) das mulheres ( $n=9$ ) nos diferentes tempos estudados.  $n$  representa o número de mulheres avaliadas.

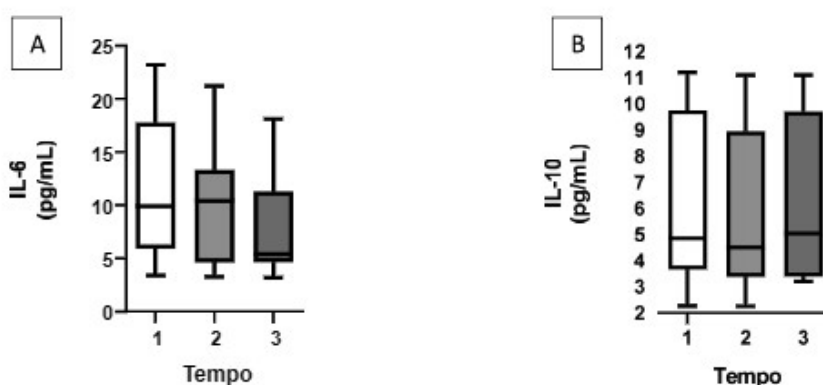


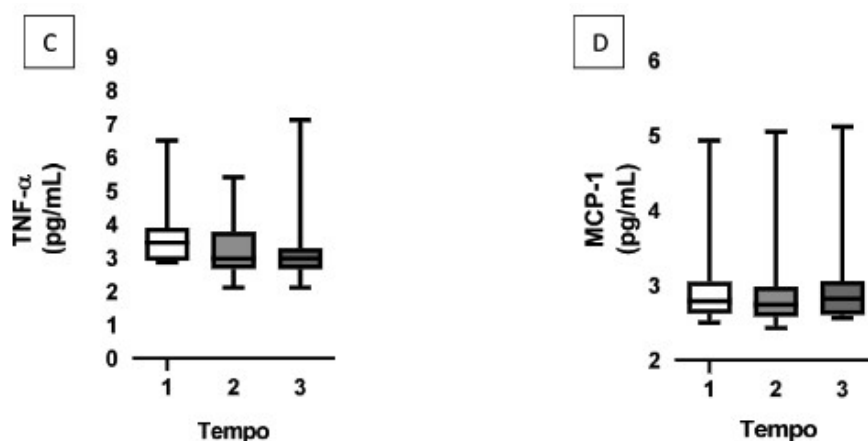


**Figura 10** - Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de Proteína C Reativa (PCR)(A); Progesterona (B); Fibrinogênio (C) e D-dímero (D) das mulheres ( $n=9$ ) nos diferentes tempos estudados.  $n$  representa o número de mulheres avaliadas.

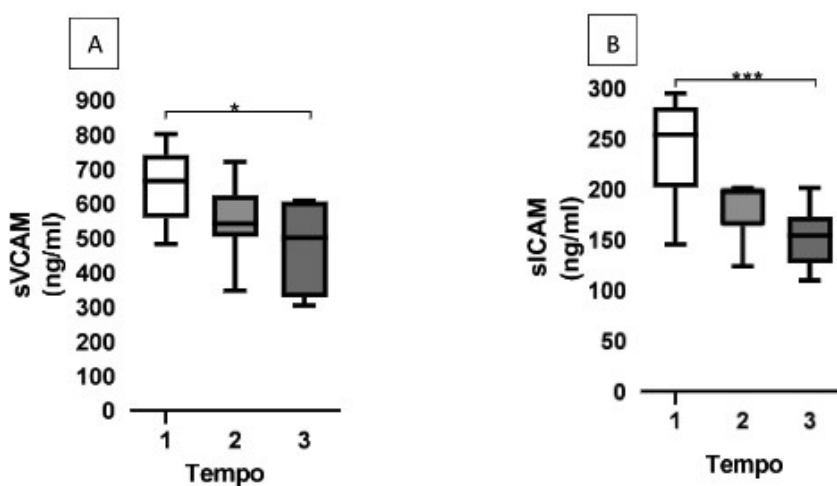
#### 4.3.5 Interleucinas e moléculas de adesão

Para determinação dos parâmetros de análise da migração celular leucocitária, foram avaliadas as interleucinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , a proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1) (figura 11), onde não foram observadas diferenças entre os três tempos estudados. Entretanto, a quantificação de moléculas de adesão VCAM e ICAM solúveis (figura 12A e 12B, respectivamente) apresentaram redução estatisticamente significativa quando comparado o tempo 1 com o tempo 3 do estudo, com destaque para os valores de ICAM, os quais demonstram uma redução significativa nas dosagens séricas ao longo dos três tempos estudados.





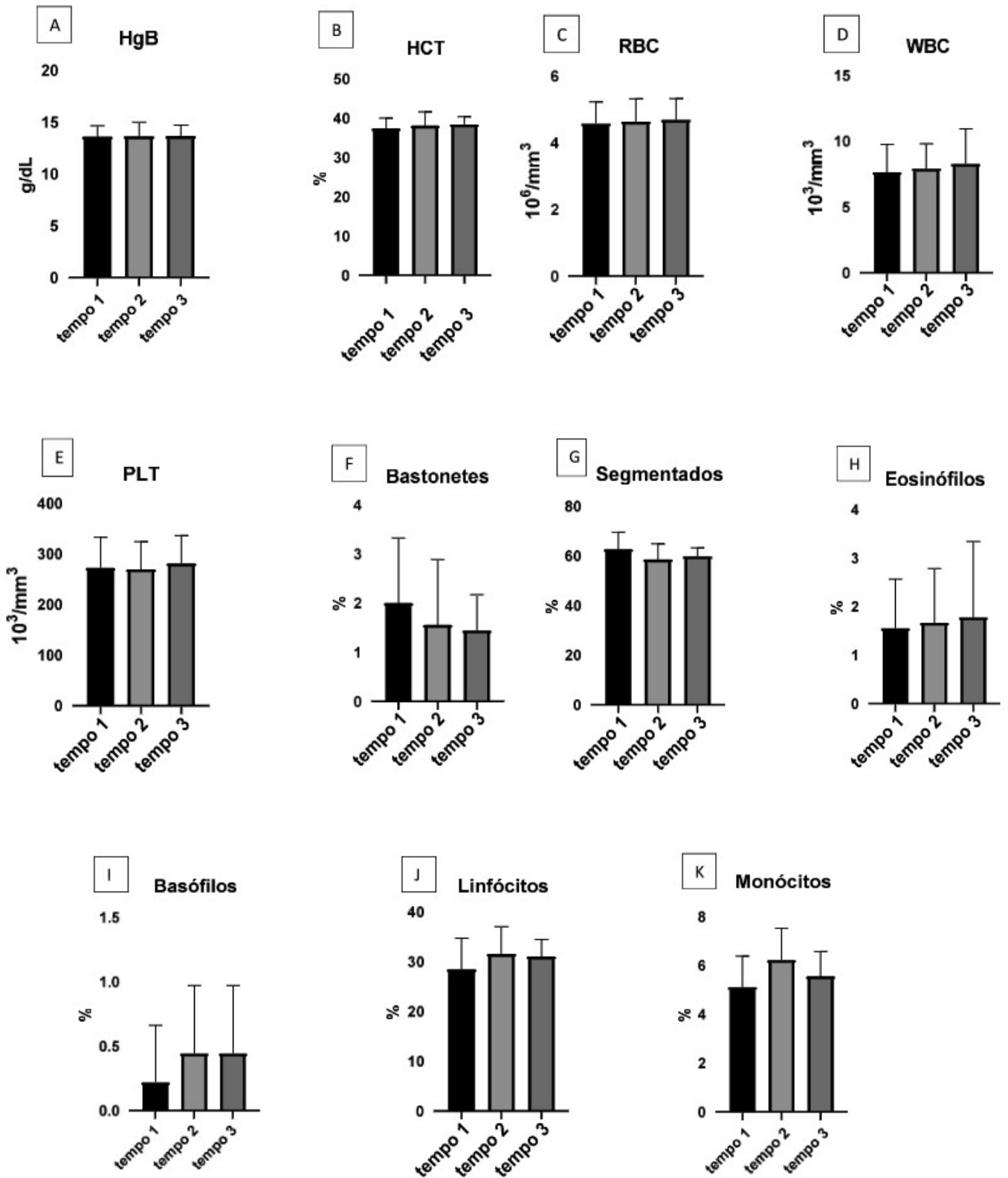
**Figura 11-** Valores expressos em mediana, primeiro quartil, terceiro quartil e valor máximo e mínimo da dosagem de IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- $\alpha$  (C) e MCP-1 (D) das mulheres ( $n=9$ ) nos diferentes tempos estudados.  $n$  representa o número de mulheres avaliadas.



**Figura 12 -** Valores expressos em mediana, primeiro quartil, terceiro quartil e valor máximo e mínimo da dosagem de sVCAM (A) e sICAM (B) das mulheres ( $n=9$ ) nos diferentes tempos estudados.  $n$  representa o número de mulheres avaliadas.

#### 4.3.6 Avaliação hematológica

A análise hematológica da hemoglobina (Hgb); hematócrito (HCT); contagem de glóbulos vermelhos (RBC); contagem de glóbulos brancos (WBC, leucócitos); plaquetas (PLT); e do diferencial dos leucócitos em Bastonetes; Segmentados; Eosinófilos; Basófilos; Linfócitos e Monócitos, foram avaliados nos tempos 1, 2 e 3 do estudo, conforme figura 13 e também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados.



**Figura 13-** Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão de hemoglobina (Hgb) (A); hematócrito (HCT) (B); contagem de glóbulos vermelhos (RBC) (C); contagem de glóbulos brancos (WBC) (D); plaquetas (PLT) (E); Bastonetes (F); Segmentados (G); Eosinófilos (H); Basófilos (I); Linfócitos (J) e Monócitos (K) das mulheres (n=9) nos diferentes tempos estudados. *n* representa o número de mulheres avaliadas.

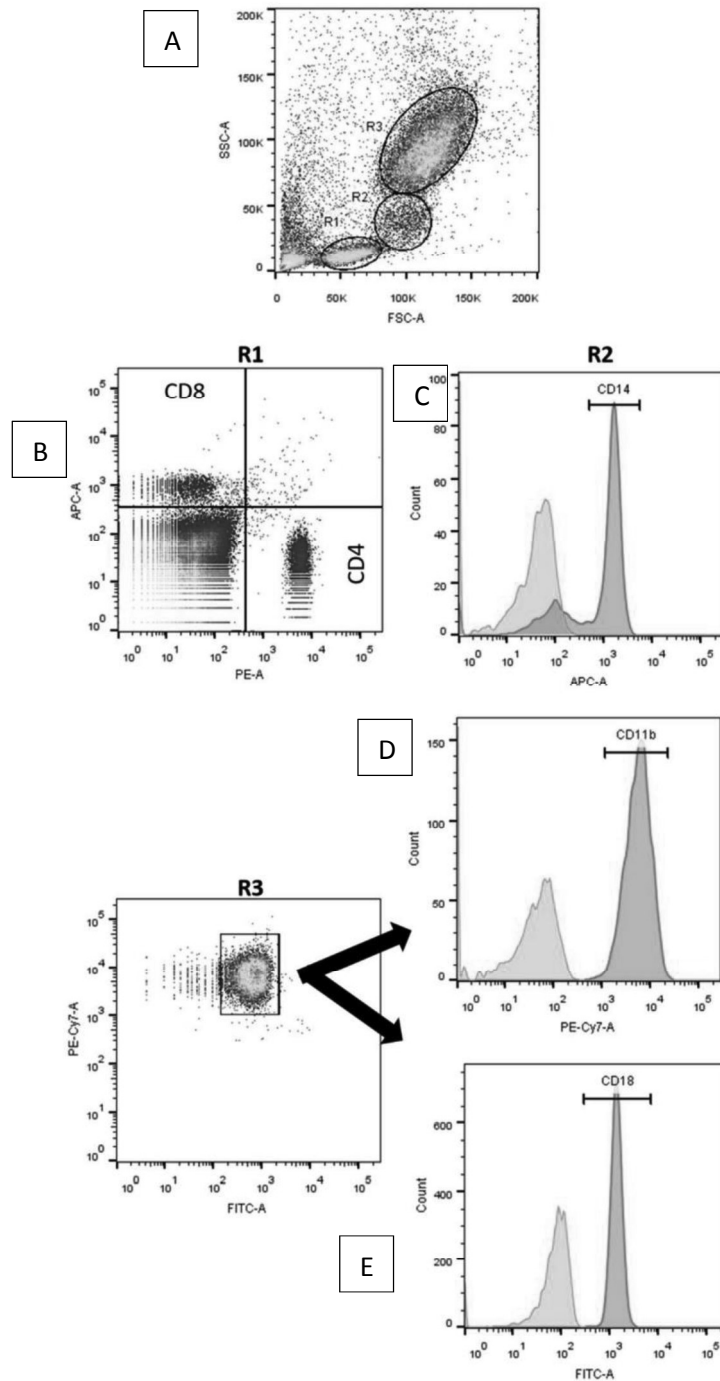
#### **4.4 Citometria de fluxo**

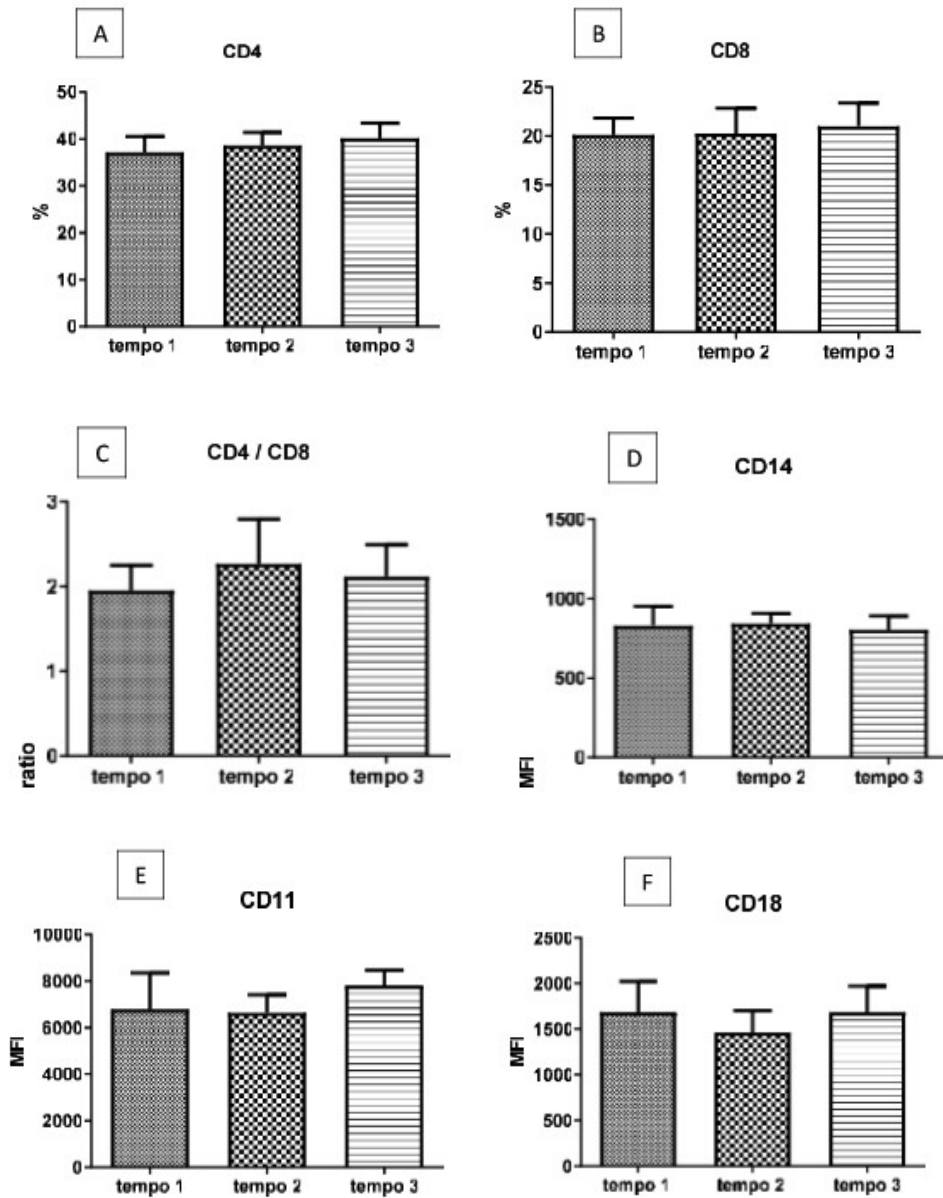
##### **4.4.1 Imunofenotipagem leucocitária**

Para determinação imunofenotípicas de interesse dos leucócitos sanguíneos foram selecionados os marcadores CD4, CD8 e CD14, e os marcadores CD11b e CD18 para caracterização de moléculas participantes do processo de migração celular.

Os histogramas foram obtidos por meio da citometria de fluxo e os resultados e estratégia de análise estão apresentados na figura 14 (A-E). Os resultados apresentados na figura 15 (A-F) demonstram não haver diferenças entre os parâmetros avaliados.

**Figura 14** – Estratégia de análise referente à marcação fenotípica FSC x SSC (A) de células do sangue periférico; percentual de células CD4 e CD8 positivas marcadas no gate R1 (B); intensidade da fluorescência de CD14 para células marcadas no gate R2 (C); intensidade da fluorescência de CD11b (D) e CD18 (E) marcadas no gate R3.



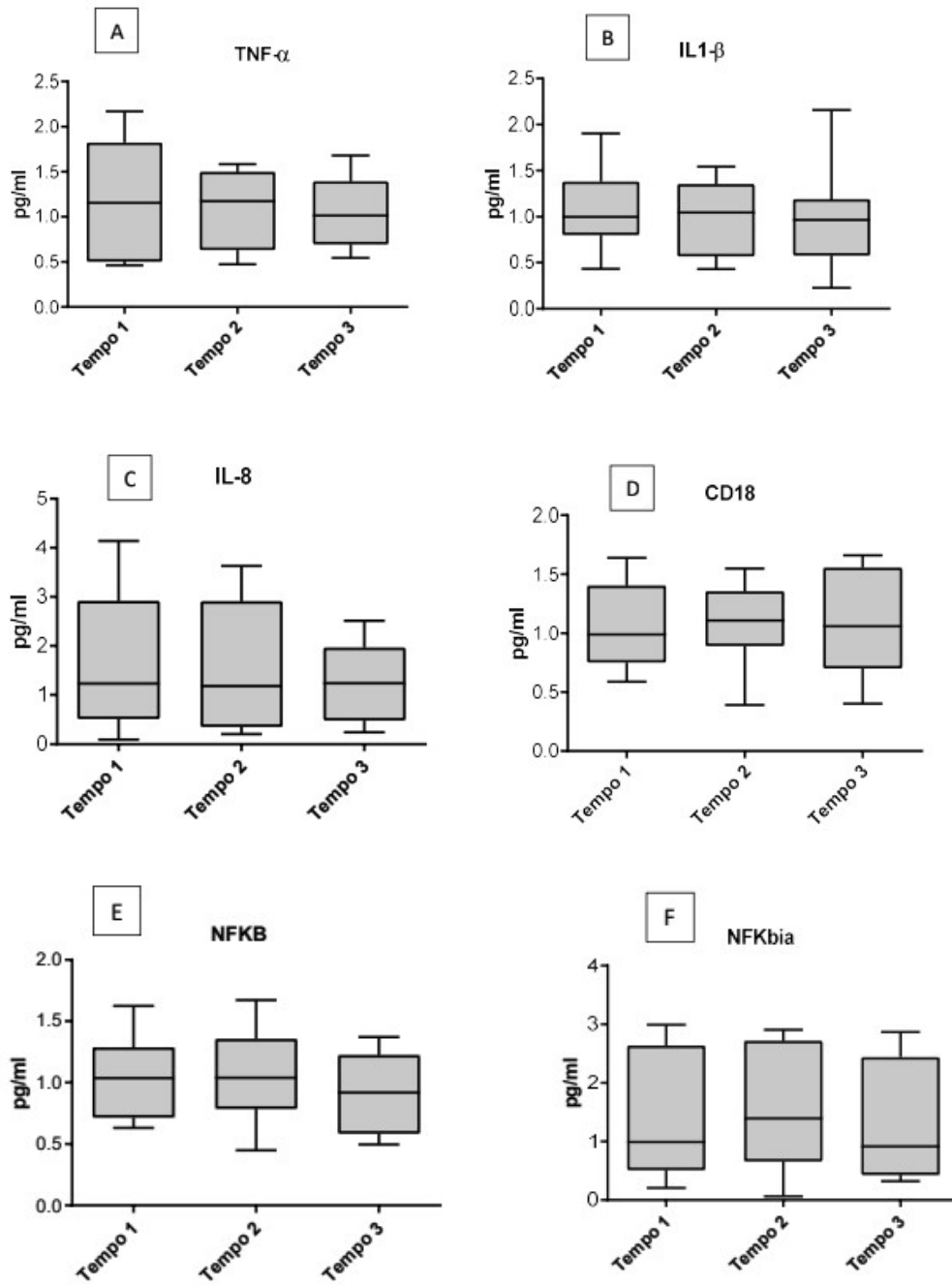


**Figura 15-** Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da marcação fenotípica de CD4 (A), CD8 (B), razão CD4/CD8 (C) e MFI de CD14 (D); CD11 (E) e CD18 (F) das mulheres ( $n=9$ ) nos diferentes tempos estudados.  $n$  representa o número de mulheres avaliadas.

#### 4.5 Avaliação Biologia Molecular (rtPCR)

A análise da quantificação da expressão gênica foi realizada em células polimorfonucleadas periféricas pela técnica de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) em tempo real. Foram avaliadas as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-8, as citocinas TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e NF- $\kappa$ B $\beta$  e a integrina CD18. Em todos os parâmetros não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os três tempos estudados (figura 16).



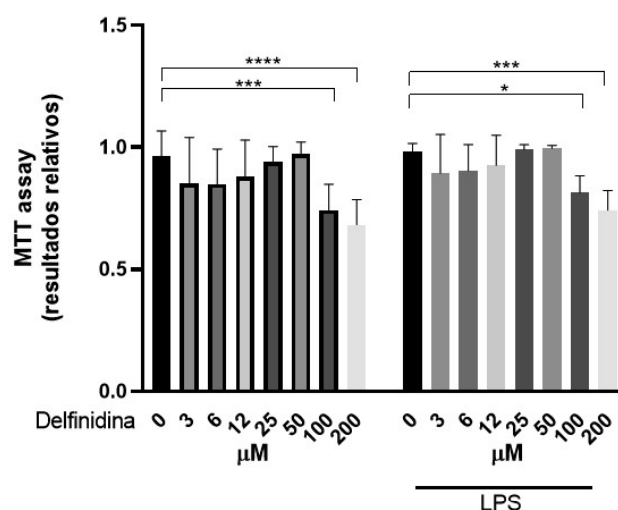


**Figura 16** - Valores expressos em mediana, primeiro quartil, terceiro quartil e valor máximo e mínimo da expressão de RNAm de (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-8, (D) CD18, (E) NFkB e (F) NFkBia nos polimorfonucleados isolados das mulheres (n=9) nos diferentes tempos estudados. *n* representa o número de mulheres avaliadas.

## 5. RESULTADOS *IN VITRO*

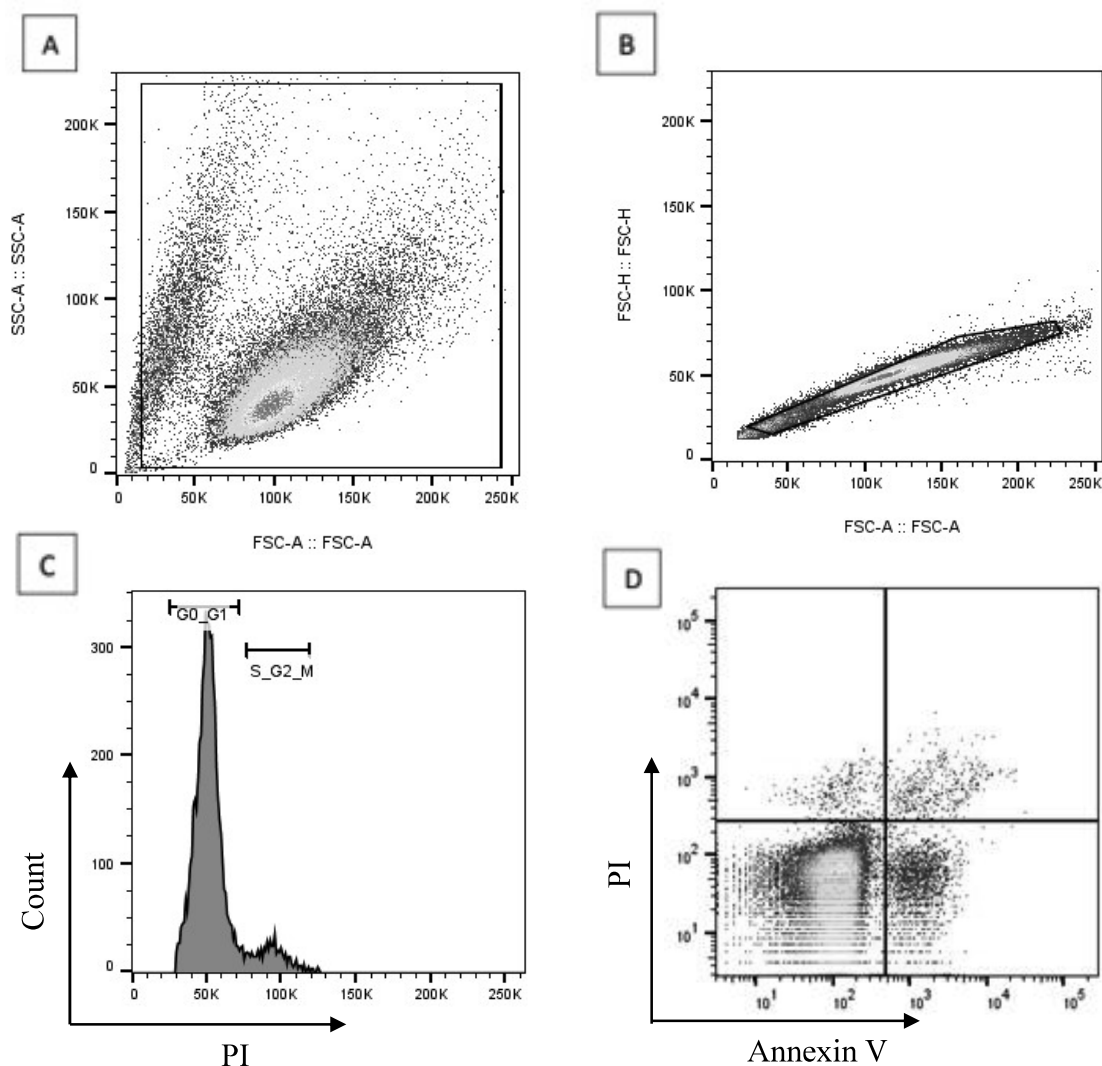
### 5.1 Ensaio de proliferação celular

Os resultados do ensaio de MTT estão apresentados na figura 17 foram separados em dois grupos: com e sem estímulo de LPS. Em ambos os grupos ocorreram diferenças significativas ao comparar células estimuladas com doses maiores que 100  $\mu\text{M}$  de delfinidina com células cultivadas na ausência de delfinidina, demonstrando um efeito citotóxico em doses maiores que 100  $\mu\text{M}$  de delfinidina, independente do estímulo com LPS.



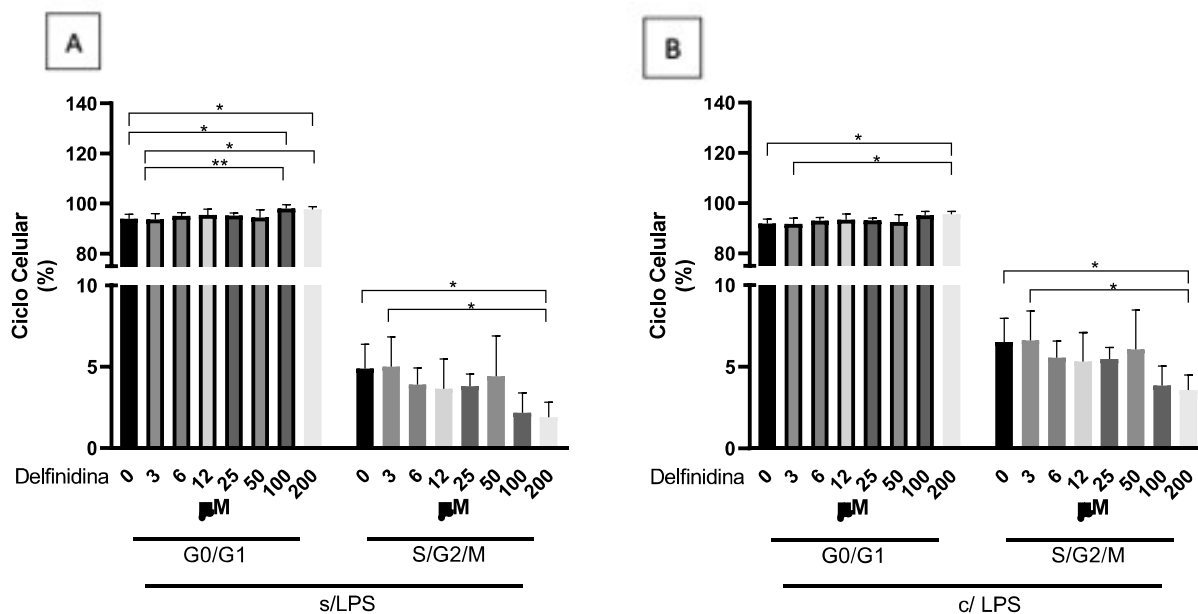
**Figura 17** - Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da citotoxicidade celular segundo ensaio colorimétrico MTT em células C1498 cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de delfinidina, e estimuladas ou não com LPS. (n=9, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \*  $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5.2 Avaliação do ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo



**Figura 18** - Estratégia de análise referente ao ciclo celular e apoptose das células C1498 cultivada *in vitro*. FSC x SSC (A); Seleção de Single Cells (B); Ciclo Celular (C) e Apoptose (D).

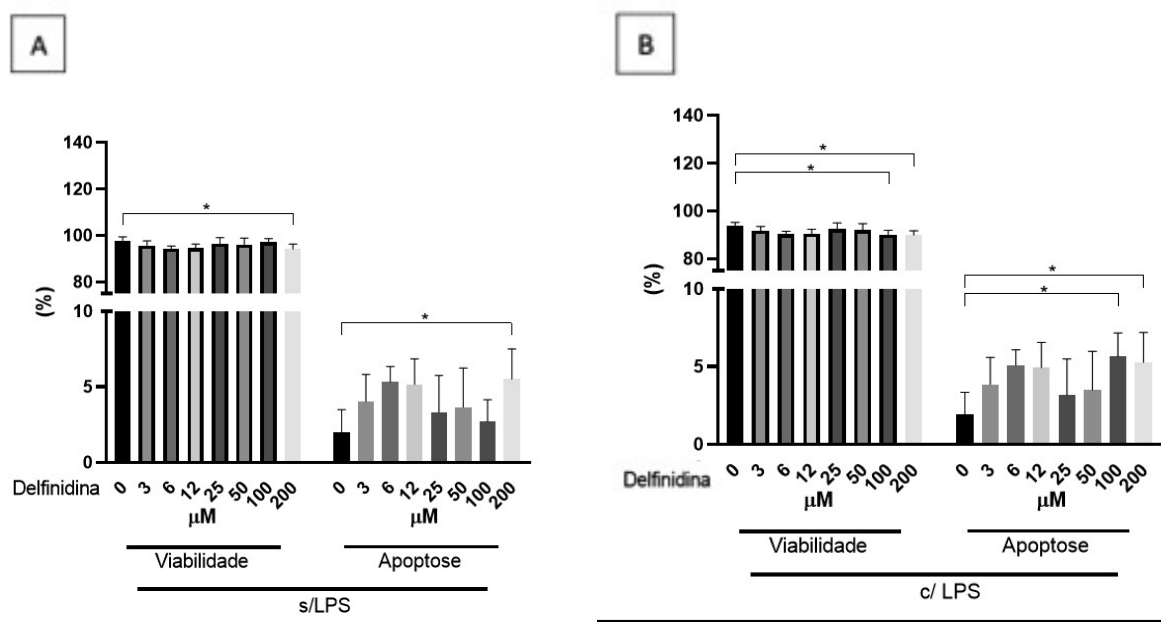
Para avaliação do ciclo celular nas diferentes concentrações de delfinidina, foram avaliados grupos nas interfases G0/G1 e S/G2/M, ambos com e sem estímulo de LPS. Quando comparados entre si, podemos observar que a dose de 200 $\mu$ M de delfinidina, na ausência (figura 19A) ou presença (figura 19B) de LPS diminuiu a porcentagem de Células na fase S/G2/M do ciclo celular em comparação com as células cultivadas na ausência de delfinidina ou até mesmo cultivadas com 3 $\mu$ M de delfinidina.



**Figura 19** - Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão do ciclo celular por citometria de fluxo do grupo sem estímulo de LPS em células C1498 cultivadas *in vitro* em diferentes doses de delfinidina (A e B). (n=6, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

### 5.3 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo

A porcentagem de células em apoptose após o cultivo com delfinidina também foi avaliado. Os resultados mostram que células cultivadas tanto estimuladas ou não com LPS, mostraram aumento significativo na porcentagem de apoptose quando estas foram cultivadas com doses maiores de delfinidina, sendo que quando as células não foram estimuladas essa diferença foi entre o grupo sem tratamento com delfinidina e o grupo tratado com 200µM de delfinidina (figura 20A), já quando as células também foram estimuladas com LPS também observamos diferenças além do grupo 200µM, também diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com 100µM de delfinidina – figura 20B).

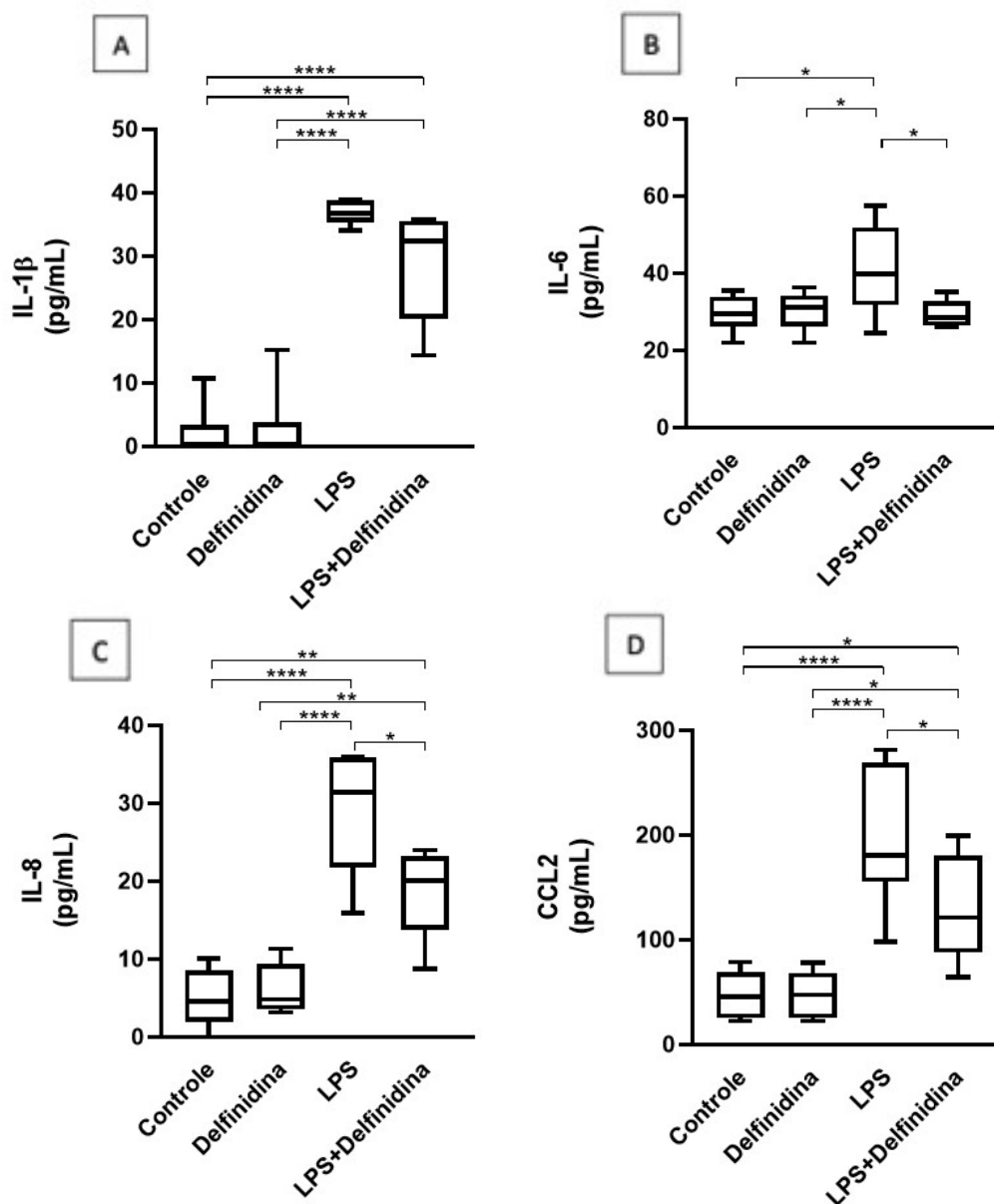


**Figura 20** - Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da apoptose e viabilidade celular por citometria de fluxo do grupo sem estímulo de LPS em células C1498 cultivadas *in vitro* em diferentes doses de delfinidina (A e B). (n=6, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \* p<0,05

#### 5.4 Avaliação de citocinas produzidas por C1498

Frente aos resultados encontrados com os testes apresentado anteriormente, optamos por trabalhar nas etapas seguintes com 50 $\mu$ M de delfinidina, por ser a maior dose estudada que não afeta a morte e ciclo celular. Dessa forma as células foram tratadas com 50 $\mu$ M e estimuladas ou não com LPS para posterior coleta do sobrenadante e dosagem das citocinas de interesse.

Os resultados mostraram que a delfinidina per si não foi capaz de alterar a concentração de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e CCL2 (figura 21 A-D). Também foi observado que o LPS foi capaz de aumentar a produção dessas citocinas e que a delfinidina foi capaz de reduzir significativamente a produção de IL-6, IL-8 e CCL2 (figura 21 B-D). Entretanto, em relação a IL-1 $\beta$  (figura 21A), apesar de existir uma tendência em reduzir sua produção após as células serem cultivadas com delfinifina e estimuladas com LPS e comparada com as células somente estimuladas com LPS, esse achado não foi estatisticamente significativo.

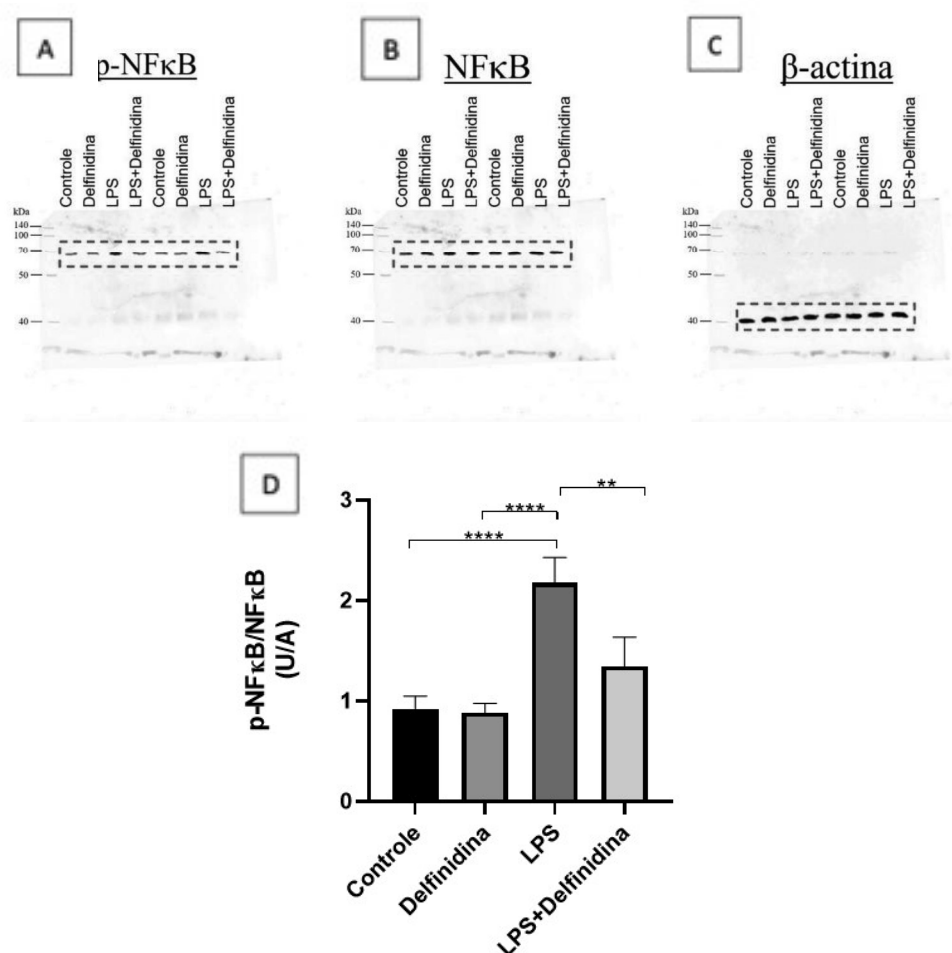


**Figura 21** - Valores expressos em mediana, primeiro quartil, terceiro quartil e valor máximo e mínimo das concentrações de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6, (C) IL-8, e (D) CCL2 em células C1498 cultivadas *in vitro* nos quatro diferentes grupos (n=6, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \* p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*\*p<0,0001.

### 5.5 Avaliação da expressão de NF $\kappa$ B total e fosforilado.

As células cultivadas com delfinidina e estimuladas ou não com LPS foram coletadas para a quantificação do fator de transcrição NF $\kappa$ B. Como pode ser observado na figura 22, os resultados apresentaram um perfil semelhante ao observado em relação as dosagens de citocinas, onde a delfinidina *per se* não alterou a expressão da relação p-NF $\kappa$ B/ NF $\kappa$ B, porém o LPS aumentou significativamente essa relação e células

estimuladas com LPS quando cultivadas com delfinidina apresentam redução significativa da relação p-NFκB/ NFκB em comparação com células somente estimuladas com LPS.

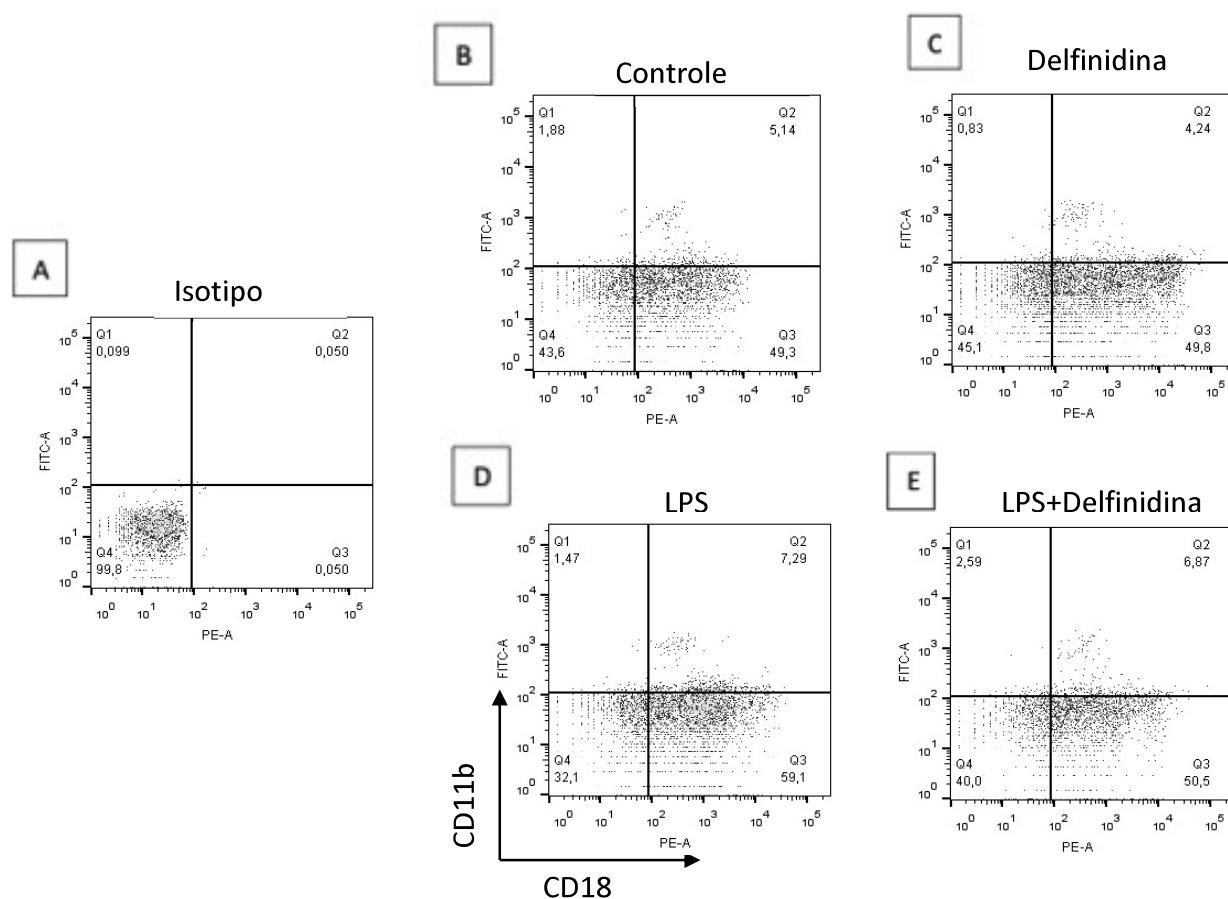


**Figura 22** - Resultado dos efeitos da Delfinidina na expressão de NF-κB total e fosforilado. Resultados expressos em média ± desvio padrão da relação de p-NFκB e NFκB nos grupos controle, delfinidina, LPS e LPS + delfinidina em células C1498 cultivadas *in vitro* (A, B, C e D). (n=6, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \* p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*\*p<0,0001.

## 5.6 Imunofenotipagem celular da linhagem C1498

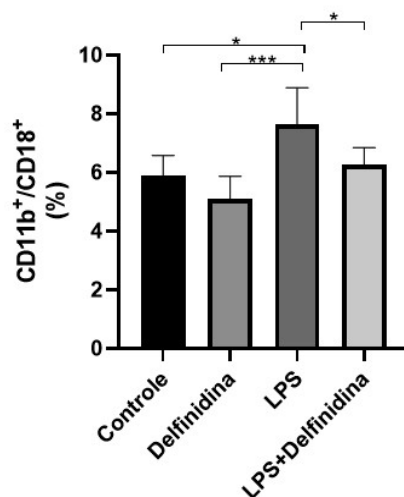
Na figura 23 é representada a estratégia de análise das células C1498 cultivadas *in vitro* do grupo controle, delfinidina, LPS e LPS + delfinidina, através da citometria de fluxo, conforme imagens A, B, C, D e E. Foram selecionados os marcadores CD11b e CD18 para caracterização de moléculas de adesão leucocitárias participantes do processo de migração celular.

De acordo com a figura 24, as diferenças da relação CD11b/CD18 foram significativas quando realizada a comparação entre os grupos, demonstrando uma interferência positiva da delfinidina na redução desses parâmetros após estímulo com LPS.



**Figura 23** - Estratégia de análise referente à marcação fenotípica de células C1498 cultivadas *in vitro* nos grupos controle, delfinidina, LPS e LPS + delfinidina com marcadores CD11b e CD18. A) *Gating* da população total de células. B) *Dot plot* para o grupo controle. C) *Dot plot* para o grupo da delfinidina. D) *Dot plot* para o grupo LPS. E) *Dot plot* para o grupo LPS + delfinidina.

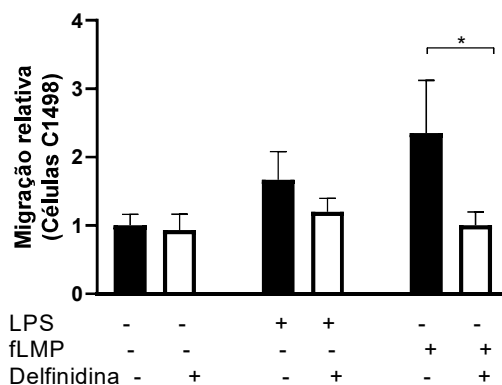




**Figura 24** - Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem da dupla marcação fenotípica de CD11b<sup>+</sup>/CD18<sup>+</sup> em células C1498 cultivadas *in vitro* nos quatro diferentes grupos. (n=6, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \* p<0,05 e \*\*\*p<0,001.

### 5.7 Efeito da delfinidina sobre a migração celular da linhagem C1498

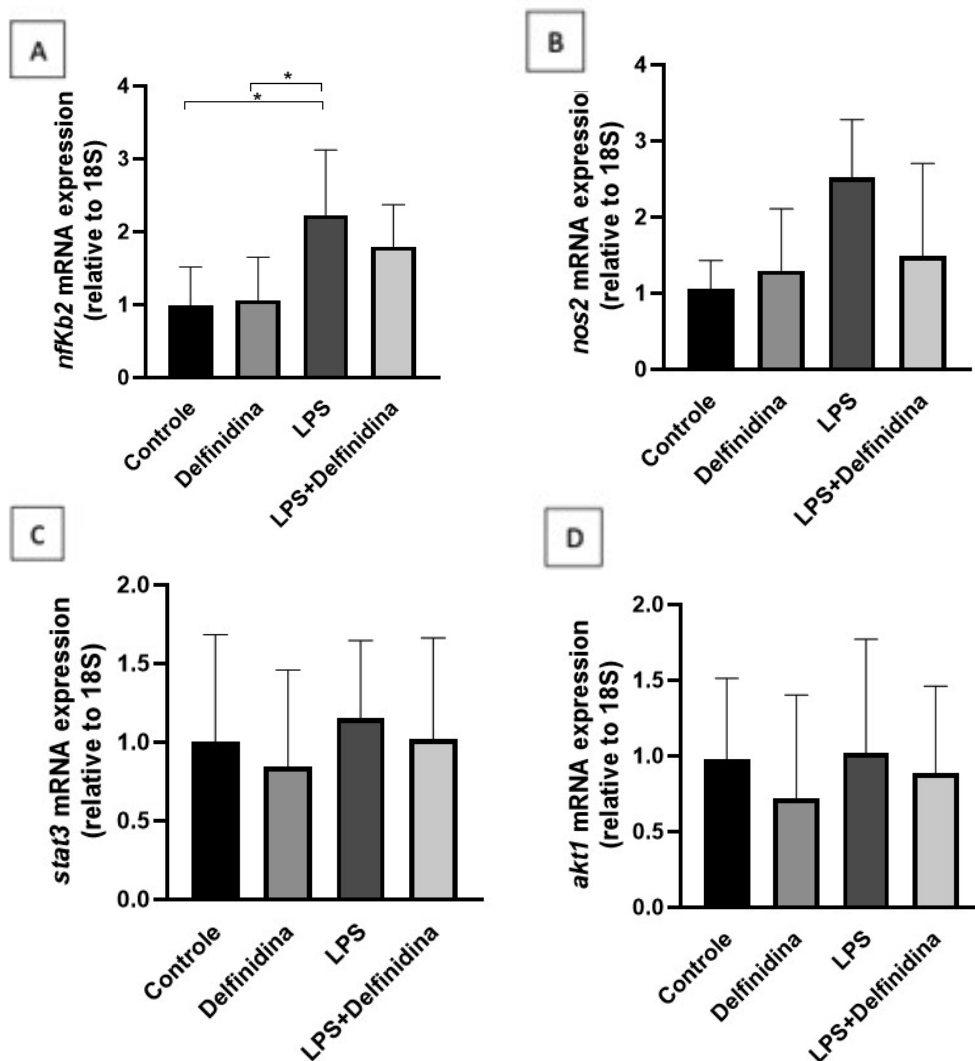
Dando seguimento às análises referentes ao potencial regulador da delfinidina sobre o potencial migratório de células C1498, foi avaliado o efeito biológico da delfinidina sobre a capacidade *in vitro* de migração. Como resultado, podemos observar na figura 25, que o LPS não foi um bom estimulador para a migração celular da linhagem de células C1498. Entretanto, observamos redução significativa na migração de células C1498, quando essas foram estimuladas com fMLP e comparadas com células estimuladas com fMLP e tratadas com delfinidina, demonstrando interferência positiva deste composto bioativo no controle da migração celular.

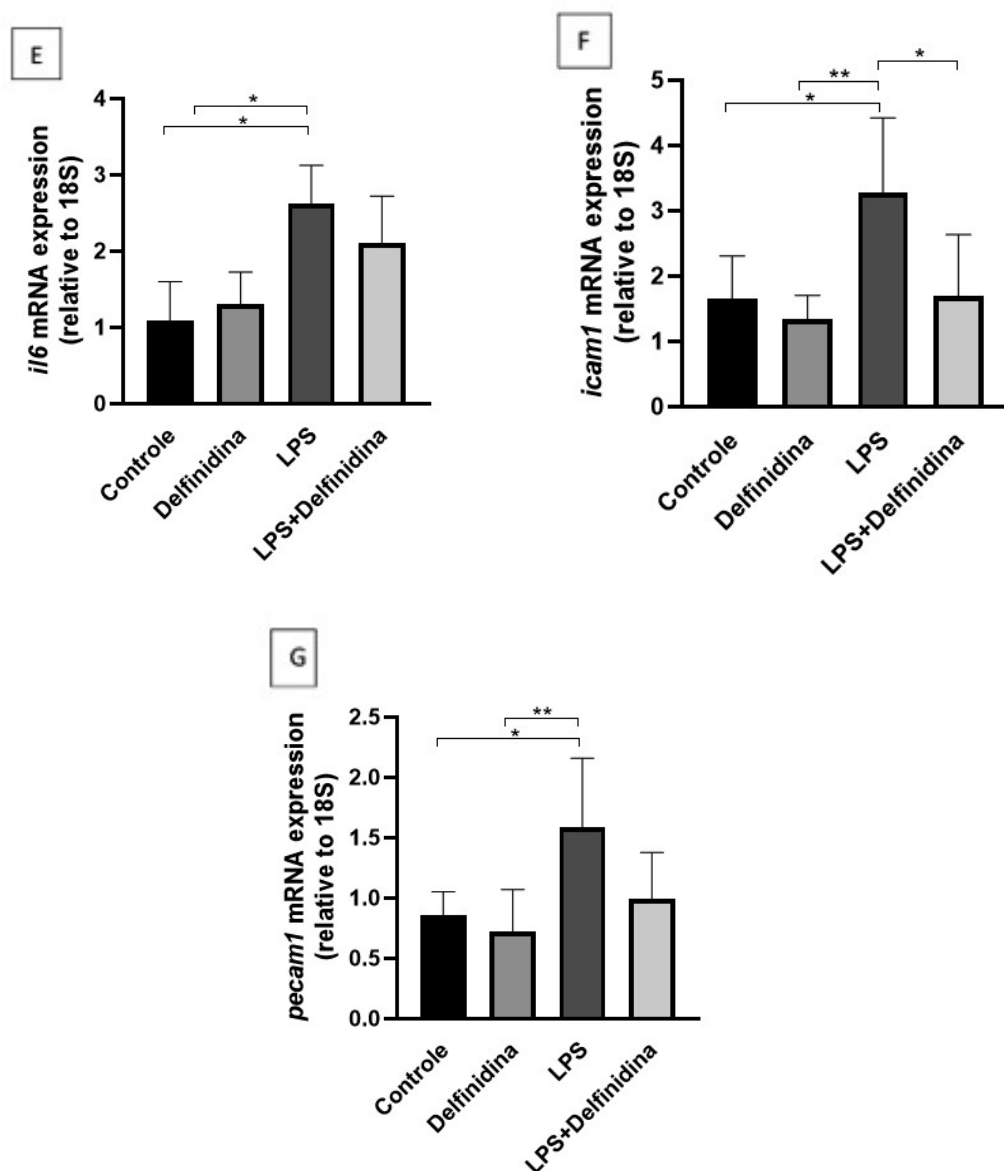


**Figura 25** – Efeitos da delfinidina sobre a migração da linhagem celular C1498 em grupo estimulado com LPS e grupo estimulado com fMLP. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. (n=4, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \* p<0,05.

## 5.8 Avaliação Biologia Molecular (rtPCR)

Adicionalmente foram avaliados a expressão gênica de NFKB2, NOS2, STAT3, AKT1, IL-6, ICAM-1 e PECAM-1 (figura 26 A-G). Em relação aos resultados não observamos diferenças estatísticas na expressão dos genes NOS2, STAT3, AKT1 entre os grupo estudados. Em relação a expressão gênica de NFKB2, IL-6 e PECAM-1, apesar de observamos aumento nas células que foram estimuladas com LPS, não foi encontrada diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos LPS com o grupo LPS tratado com delfinidina. Entretanto, a expressão de ICAM-1 apresentou redução significativa no grupo com delfinidina após estímulo com LPS quando comparado com o grupo tratado com LPS e não tratado com delfinidina, evidenciando a participação da delfinidina na redução da expressão gênica de importante molécula de adesão.





**Figura 26** – Efeitos da delfinidina sobre a expressão gênica de NFKB2, NOS2, STAT3, AKT1, IL-6, ICAM-1 e PECAM-1 em células da linhagem celular C1498 cultivadas *in vitro* nos quatro diferentes grupos. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (A – G). (n=6, n representa o número de amostras independentes utilizadas por grupo). \*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ .

## 6. DISCUSSÃO

Muitos benefícios para a saúde são creditados aos compostos bioativos presentes em frutas e hortaliças, dentre eles pode-se destacar as antocianinas, sub grupo dos flavonoides, presentes nas uvas. Entre as frutas mais consumidas do mundo está a uva (BRASIL, 2016), contém diversos nutrientes e compostos bioativos com propriedades biológicas, destacando-se como uma das principais fontes de compostos fenólicos quando comparada a outras frutas e vegetais (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

Concentrações significantes de antocianinas, (petunidina, peonidina, malvidina, cianidina e delphinidina) (CABRITA *et al.*, 2003) e catequinas estão presentes na uva e no suco dessa fruta (CASTILLA *et al.*, 2006), quando presentes regularmente na dieta apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-proliferativa, podendo exercerefeitos positivos no controle a diversas DCNT (MARTIN; APPEL, 2010).

Alguns estudos mostram que, após a ingestão aguda e/ou crônica de suco de uva, existem benefícios para o sistema cardiovascular como redução do colesterol, tendência a redução de triglicérides, controle da diabetes mellitus, entre outros aspectos associados a obesidade (GRAF *et al.* 2013, KELISHADI *et al.* 2011, CASTILLA *et al.* 2006, BARONA *et al.* 2012). Os principais mecanismos responsáveis pela redução deste fator de risco incluem redução da coagulação plaquetária e aumento da circulação de lipoproteína de alta densidade (HDL). Outros mecanismos, como a inibição da oxidação da lipoproteína, eliminação de radicais livres e modulação do metabolismo de eicosanóides também são considerados por desempenhar papel na redução da aterosclerose (MAZZA, 2007). Tais mecanismos, apesar de não encontrarmos diferenças estatísticas, poderiam ser associados a tendência de aumento nas concentrações de HDL colesterol encontradas no presente estudo.

Estudos conduzidos em modelos animais bem como em humanos, mostram um efeito positivo associado a ingestão de suco de uva em alguns aspectos inflamatórios, como aumento da produção de IL-10, uma potente citocina regulatória, bem como redução de ânion superóxido e proteína quimioatratente de monócitos (MCP-1) (KELISHADI *et al.* 2011, CASTILLA *et al.* 2008). Entretanto, apesar de existir relatos na literatura, em nosso estudo, na etapa 1 (*in vivo*) não foram encontradas diferenças significativas nos padrões inflamatórios de MCP-1 e NFkB. Contudo, existem poucos estudos na literatura mostrando os efeitos da ingestão do suco de uva sobre parâmetros de migração de neutrófilos associados aos mecanismos exercidos por essas células na aterosclerose como a expressão de proteínas da família das RhoGTPases e CDC42 que participa do processo de migração de neutrófilos (CASTILLA *et al.* 2006, DÁVALOS *et al.* 2009, BARONA *et al.* 2012, CONAWAY *et al.* 2017).

A etapa *in vivo* do presente estudo demonstrou tendência de redução de concentração sérica de IL-6, onde tal achado pode ser corroborado por Kelishadi e colaboradores (2011) que mostraram que a ingestão do suco de uva por adolescentes em estado de síndrome metabólica induziu a uma diminuição na expressão de moléculas de

adesão (E-selectina) e IL-6 após o consumo. Comprovando que o suco de uva modula importantes funções fisiológicas que desempenham um papel na aterosclerose.

Conforme pesquisa de Chen *et al* (2011), a delphinidina atenuou significativamente a expressão de P-selectina e ICAM-1 e inibiu a adesão de monócitos às células endoteliais induzida por ox-LDL, e esses efeitos da delphinidina foram relacionados à inibição de ROS Via / p38MAPK / NF-kB. Corroborando com a avaliação de possíveis efeitos anti-inflamatórios da delphinidina, a etapa *in vivo* do presente estudo demonstrou redução significativa nas dosagens séricas de VCAM e ICAM solúveis.

A literatura relata que a delphinidina apresenta propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, exercendo efeitos sobre a diferenciação e proliferação de linfócitos T associados aos processos inflamatórios presentes nas doenças cardiovasculares (DAYOUB *et al.* 2017). O estudo de Hou *et al* (2005) foi o primeiro a apresentar evidências moleculares de que as antocianidinas e agliconas de antocianinas inibiram a expressão de COX-2 em células de macrófagos RAW264 em LPS ativado, bloqueando a transcrição mediada por MAPK.

Adicionalmente, o efeito protetor das antocianinas nas células endoteliais também foi estudado e despertou interesse como promissor recurso terapêutico contra uma ampla variedade de doenças envolvendo danos com radicais livres incluindo aterosclerose, onde foi relatado que algumas antocianinas, como delphinidina, cianidina e petunidina, influenciaram a proliferação e distribuição do ciclo celular de células endoteliais e regulam a expressão de alguns genes relacionados à aterosclerose, incluindo endotelina-1 (ET-1) e óxido nítrico sintase (eNOS) (CHEN *et al.*, 2011). Apesar de nossos resultados não apresentarem diferenças estatísticas, algumas tendências anti-inflamatórias dentro do quadro de proteção à aterosclerose foram observadas na etapa *in vivo*, como tendência à redução da expressão gênica de fatores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-8.

De acordo com Watson e Schonlau (2015), a potente propriedade antioxidante da delphinidina ocorre devido ao maior número de grupos hidroxila no anel B. A delphinidina aumenta a expressão endotelial da sintase do óxido nítrico e diminui a expressão da endotelina-1 vasoconstritora, assim como também inibe a expressão das moléculas de adesão ICAM e VCAM, diminui a atividade plaquetária e pode contribuir para a prevenção da trombose. Reparo da função endotelial, redução da agregabilidade plaquetária e efeitos vasculares anti-inflamatórios, são alguns dos resultados apresentados pelas pesquisas com delphinidina. Corroborando com o estudo de Watson e Schonlau

(2015), observamos resultados estatisticamente significativos nas dosagens de sVCAM e sICAM quando comparado o tempos de estudo 1 e 3 do estudo *in vivo*. Já na etapa *in vitro*, a expressão de ICAM-1 foi significativamente menor após o estímulo com LPS e tratamento com delfinidina.

Um estudo utilizando delfinidina-3-sambubiosídeo (Dp3-Sam), uma antocianina do *hibiscus*, avaliou suas propriedades anti-inflamatórias e foi observado sua capacidade de mitigar os níveis de mediadores inflamatórios incluindo iNOS, NO, IL-6, MCP-1 e TNF- $\alpha$ , além de regular negativamente a via NF $\kappa$ B e a sinalização de MEK 1 e 2 e ERK 1 e 2, demonstrando tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* potenciais propriedades anti-inflamatórias da Dp3-Sam (SOGO, 2015).

Dessa forma, para testarmos nossa hipótese utilizamos uma linhagem de células mielóides com características neutrofilicas (C1498) e diversos aspectos da capacidade da delfinidina modular essa célula quando estimulada com LPS foi estudado. Alguns experimentos mostraram o significativo potencial anti-inflamatório da delfinidina-3-glicosídeo *in vitro*, atenuando diversos moduladores da resposta inflamatória, entre eles: IL-6, IL-8, CCL2, o fator de transcrição NF $\kappa$ B, a expressão de CD11b/CD18, a migração celular e a expressão gênica de ICAM-1, o que demonstra correlações com os expostos em Chen *et al* (2011), Watson e Schonlau (2015).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) são as primeiras células imunes inatas a responder à infecção ou lesão tecidual. (MAYADAS *et al.*, 2014). Além do seu papel como fagócitos, os PMN contribuem para a restituição da homeostase da mucosa em estágios posteriores de uma resposta inflamatória (FOURNIER e PARKOS, 2012). No entanto, sob condições de inflamação não resolvida, a migração contínua de PMN e a liberação de agentes antimicrobianos tóxicos contribuem diretamente para o dano tecidual. O influxo desregulado de PMN nos tecidos é uma marca patológica de várias doenças inflamatórias crônicas (BRESSENOT *et al.*, 2015 e SIMPSON *et al.*, 2009).

O tráfego de PMN para locais inflamação começa com o rolamento no endotélio vascular mediado por interações de adesão entre selectinas e seus ligantes glicosilados (KANSAS, 1996 e McEYER, 1997). O ritmo de PMN durante a rolagem é desencadeada por quimiocinas / citocinas e mediada pela ligação das integrinas CD11a e CD18 às imunoglobulinas expressas no endotélio, como ICAM-1 e VCAM-1. A etapa final da migração transendotelial de PMN envolve a passagem para o interstício através de rotas paracelulares ou transcelulares (LEY *et al.*, 2007 e ROSEN, 1994).

Os mecanismos de migração celular são pontos importantes que foram investigados nesse estudo, demonstrando que a delfinidina possui capacidade de atenuar a migração celular. Em relação a capacidade da delfinidina modular a migração celular, um estudo realizado por Kang *et al.* (2018), demonstrou o papel da delfinidina na modulação de marcadores relacionados a transição epitélio-mesenquimal de células malignas de osteossarcoma, verificando-se que células tratadas com 75  $\mu\text{M}$  de delfinidina por 24h, a migração celular foi significativamente inibida, o que corrobora com nossos resultados.

Adicionalmente, *in vitro*, a delfinidina atenuou a expressão das integrinas CD11b e CD18, após estímulo com LPS, proporcionando uma ação anti-inflamatória adicional relevante. Em uma pesquisa conduzida por Yang *et al.*, 2012, foi demonstrado que a Delfinidina-3-glicosídeo (DP-3-G) diminuiu a expressão da integrina  $\alpha\text{-IIb}\beta\text{3}$  ativada nas plaquetas, e ainda inibiu a agregação plaquetária em ensaios com os agonistas ADP e TRAP (agonista da trombina).

Por acréscimo, como já comentado, redução da produção de citocinas quimiotáticas como CCL2 e a IL-8 foram observadas, *in vitro*, em células cultivadas com delfinidina e desafiadas com LPS. A CCL2 é um estimulante quimiotático de monócitos e inúmeros eventos celulares relacionados à quimiotaxia, incluindo o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a expressão de integrinas (JIANG *et al.*, 1992). Enquanto, a IL-8 é um quimiotático potente para os neutrófilos e para um subgrupo de linfócitos-T. (HUBER *et al.*, 1991). Assim como vários outros agentes de quimiotaxia, a IL-8 promove a reestruturação do citoesqueleto, oscilações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ativação de integrinas, exocitose de proteínas granulares e *burst* respiratório. (PACCAUD *et al.*, 1990).

Subsequentemente, na etapa *in vitro* um resultado relevante foi a ação da delfinidina na redução da ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B, ponto de fundamental importância para pesquisas com inflamação (Chen *et al.* 2011).

Alguns pesquisadores sugerem a atividade anti-inflamatória das antocianinas através de uma modificação específica. Estudos realizados em seres humanos indicam que as antocianinas têm a capacidade de inibir a ativação do fator nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B) (KARLSEN *et al.*, 2007), o que pode ter efeitos influentes no controle da inflamação. Além disso, pesquisas imunes que esses compostos são capazes de inibir a resposta inflamatória e a apoptose de células endoteliais humanas induzidas pelo fator CD40 (LING *et al.*, 2009), sugerindo um potencial papel protetor contra processos

inflamatórios. Outros estudos apontaram que as antocianinas também podem reduzir a frequência de núcleos necróticos grandes, diminuir a espessura da cápsula fibrosa e aumentar o conteúdo de colágeno tipo 1 (XIA, et al., 2006).

Todavia, apesar dos resultados encontrados nos testes *in vitro* serem mais promissores dos que os encontrados *in vivo*, alguns pontos devem ser destacados em relação aos estudos realizados em humanos que não permitiram observações mais empolgantes. Foi utilizado suco de uva na etapa *in vivo* ao invés da delphinidina isolada, e apesar de verificarmos a quantidade deste composto no suco de uva, não se sabe exatamente o seu percentual de absorção ou mesmo os efeitos relacionados aos seus metabólitos. A população do estudo baseou-se em mulheres com excesso de peso e talvez essa população não tenha um processo inflamatório acentuado instalado que permita uma atenuação mais mensurável a partir da ingestão de suco de uva.

Levando em consideração todas as possíveis interações que ocorrem no metabolismo humano, especialmente em mulheres, fica complexo afirmar a atuação pontual da delphinidina no processo de interesse. A complexidade deste desfecho pode ainda ser mais desafiadora considerando o alimento um conjunto de inúmeras substâncias químicas, onde tais atuam de maneira concomitante, ativa e veloz em vários processos fisiológicos, inseridos na complexidade do metabolismo humano feminino. Todos esses fatores atrelados ao número reduzido de pacientes voluntários contribuíram para resultados *in vivo* inconclusivos.



## 7. CONCLUSÃO

Frente aos resultados encontrados, conclui-se que o consumo de suco de uva integral exerceu efeitos positivos importantes no controle da inflamação de mulheres em sobrepeso, atenuando a concentração sérica das moléculas de adesão endoteliais da família ICAM e VCAM envolvidas no processo de migração celular. Devido a relevância já comprovada em demais pesquisas, esse resultado pode demonstrar a influência positiva da delphinidina presente no suco de uva integral. Os experimentos *in vitro* também evidenciaram um papel relevante da delphinidina-3-glicosídeo no controle do processo inflamatório e migração celular, comprovados pela atenuação da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, proteínas quimiotáticas e moléculas de adesão ICAM-1, assim como a redução da ativação do fator de transcrição NFkB, diminuição da migração de células C1498 e atenuação das concentrações de integrinas CD11b e CD18.

Os resultados do estudo foram expressivos, porém vale ressaltar a importância do incentivo à realização de demais pesquisas com a mesma temática e com um maior número amostral.

## REFERÊNCIAS

ACHIKE, F. I.; TO, N.-H.P.; WANG, H.; KWAN, C.-Y. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 38, n. 1, p. 1–10, 2011.

ALLEVA, D. G. *et al.* IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production. **J Immunol.** Boston, n.159, p.29-41, 1997.

BARONA, J.; BLESSO, C.; ANDERSEN, C.; *et al.* Grape Consumption Increases Anti-Inflammatory Markers and Upregulates Peripheral Nitric Oxide Synthase in the Absence of Dyslipidemias in Men with Metabolic Syndrome. **Nutrients**, v. 4, n. 12, p. 1945–1957, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2021: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRESSENOT, A.; SALLERON J.; *et al.* Comparing histological activity indexes in UC. **Gut.** v. 64, p. 1412–1418, 2015.

CABRITA, M. J.; RICARDO -DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: I SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA. **Anais Ensenada**, México, 2003.

CASTILLA, P.; DÁVALOS, A.; TERUEL, J. L.; *et al.* Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 1053–1061, 2008.

CASTILLA, P.; ECHARRI, R.; DÁVALOS, A.; *et al.* Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 252–262, 2006.

CHANG, K.; *et al.* The state diagram for cell adhesion under flow: Leukocyte rolling and firm adhesion. **PNAS.** v. 97, n. 21, p. 11262–11267, 2000.

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

CONAWAY, E. A.; DE OLIVEIRA, D. C.; MCINNIS, C. M.; SNAPPER, S. B.; HORWITZ, B. H. Inhibition of Inflammatory Gene Transcription by IL-10 Is Associated with Rapid Suppression of Lipopolysaccharide-Induced Enhancer Activation. **The Journal of Immunology**, p. 1601781, 2017.

CONTRAN, R.S. Patologia estrutural e funcional. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.37-38, 2000.

DÁVALOS, A.; DE LA PEÑA, G.; SÁNCHEZ-MARTÍN, C. C.; et al. Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. **The British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 8, p. 1125–1135, 2009.

DAYOUB, O.; LE LAY, S.; SOLETI, R.; et al. Estrogen receptor  $\alpha$ /HDAC/NFAT axis for delphinidin effects on proliferation and differentiation of T lymphocytes from patients with cardiovascular risks. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

DEROSA, G.; FERRARI, I.; D'ANGELO, A.; SALVADEO, S.A.; FOGARI, E.; et al. Oral fat load effects on inflammation and endothelial stress markers in healthy subjects. **Heart Vessels**, v. 24, n. 3, p. 204-10, may. 2009.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; VOGEL, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v.4, p.903-914, 2002.

FERRARI, D.; CIMINO, F.; FRATANTONIO, D.; et al. Cyanidin-3-O-Glucoside Modulates the In Vitro Inflammatory Crosstalk between Intestinal Epithelial and Endothelial Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

FOURNIER, B.M.; PARKOS C.A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. **Mucosal Immunol.** v. 5, p. 354–366, 2012.

FRANCISCHETTI, I.; et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 25, n. 4, p. 575 – 584, 2010.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & Therapeutics**, v.100, p.171-194, 2003.

GALLAND, L. Diet and inflammation. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 25, n. 6, p.634-40, dec. 2010.

GE Q., BRICHARD S., YI XU., LI Q. microRNAs as a new mechanism regulating adipose tissue inflammation in obesity and as a novel therapeutic strategy in the metabolic syndrome. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

GOSZCZ, Z.; et al. Bioavailable Concentrations of Delphinidin and Its Metabolite, Gallic Acid, Induce Antioxidant Protection Associated with Increased Intracellular Glutathione in Cultured Endothelial Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, p.1 – 17, 2017.

GRAF, D.; SEIFERT, S.; JAUDSZUS, A.; BUB, A.; WATZL, B. Anthocyanin-Rich Juice Lowers Serum Cholesterol, Leptin, and Resistin and Improves Plasma Fatty Acid Composition in Fischer Rats. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e66690, 2013.

HARLOW, E., LANE, D. 1988. Immunoblotting In: *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 485.

HATADA, E.N.; KRAPPMANN, D.; SCHEIDEREIT, C.  $\beta$ kappaB and the innate immune response. **Current Opinion in Immunology**, v.12, p.52-58, 2000.

HIRAYAMA, C.; WATANABE, H.; NAKASHIMA, R.; NANBU, T.; HAMADA, A.; KUNIYASU, A.; NAKAYAMA, H.; KAWAGUCHI, T.; SAITO, H. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharm Res.** v.25, n.4, p. 827-35, Apr 2008. ISSN 0724-8741 (Print) 0724-8741 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934801>.

HOU, D.; et al. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure–activity relationship and molecular mechanisms involved. **Biochemical Pharmacology**. v. 70. p. 417 – 425, 2005.

HUBER, A.R.; KUNKEL, S.L.; *et al.* Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. **Science**. v. 254, n. 5028, p. 99-102, 1991. Erratum in: *Science*. v. 254, n. 5032, p. 631, 1991. *Science*. v. 254, n. 5037, p. 1435, 1991.

HUTTENLOCHER A., SANDBORG R.R., HORWITZ A.F. Adhesion in cell migration. **Curr Opin Cell Biol.** v 7(5), 697-706, Oct, 1995.

JIANG, Y.; BELLER, D.I.; *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol.** v. 148, n. 8, p. 2423-8, 1992.

KANG, H.; PARK, B.; KANG, H.; et al. Delphinidin induces apoptosis and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition via the ERK/p38 MAPK-signaling pathway in human osteosarcoma cell lines. **Wiley Environmental Toxicology**. v. 33, p. 640-649, feb 2018.

KARALIS, K.P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5747-54, 2009.

KARLSEN, A. *et al.* Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. **J Nutr**, v. 137, p. 1951-1954, 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v.17, p.338-344, 2005.

KELISHADI, R.; GIDDING, S. S.; HASHEMI, M.; et al. Acute and long term effects of grape and pomegranate juice consumption on endothelial dysfunction in pediatric metabolic syndrome. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 245–253, 2011.

KIMOKOTI, R.W.; MILLEN, B. Nutrition for the Prevention of Chronic Diseases. **MedClin North Am.**, v. 100, n. 6, p. 1185-1198, 2016.

KUBES P, PAYNE D, WOODMAN RC. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in post ischemic liver microcirculation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 283(1): G139-47, Jul 2002.

KUBES P. The complexities of leukocyte recruitment. **Semin Immunol.** V 14(2):65-72, Apr 2002.

LAGARRIGUE, F.; et al. The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function. **Blood.** v. 128, n. 4, p. 479 – 487, 2016.

LE, Y.; ZHOU Y.; IRIBARREN, P.; WANG, J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. **Cell Mol Immunol.** v. 1, n. 2, p. 95-104. Review, 2004.

LEE, J.Y.; SOHN, K.H.; RHEE, S.H.; HWANG, D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 16683-16689, 2001.

LEY K.; LAUDANNA C.; CYBULSKY M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v.7, p. 678–689, 2007.

LING, W., *et al.* (2009) Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. **Atherosclerosis**.vol.202, p.41-47, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 25, p. 402–408, 2001.

LOPEZ-GARCIA, E.; SCHULZE, M.B.; MEIGS, J.B.; MANSON, J.E.; RIFAI, N.; STAMPFER, M.J.; *et al.* Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 3, p. 562–6, mar. 2005.

LOUZADA, M.L. da C.; MARTINS, A.P.B.; *et al.* Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Rev Saude Publica.** v. 49, 2015.

LOUZADA, M.L. da C.; MARTINS, A.P.B.; *et al.* Impact of ultra-processed foods on micronutrient content in the Brazilian diet. **Rev Saude Publica.** v. 49, 2015.

LOUZADA, M.L. da C.; MARTINS, A.P.B.; *et al.* Alimentação e saúde: a fundamentação científica do guia alimentar para a população brasileira. Available from: <http://www.biblioteca.fsp.usp.br>. 2019.

MAGNANI, M.; CRINELLI, R.; BIANCHI, M.; ANTONELLI, A. The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). **Current Drug Targets**, v.1, p.387-399, 2000.

MAJOLO F M; REIS B Z. **Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos: Avanços científicos, perspectivas e desafios**. São Paulo: ILSI Brasil. v. 9, p. 13-23, 2018.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciênc.Tecnol.Aliment.**, v.25, n.4, p.659-664, 2005.

MALACRIDA, C. R. Compostos fenólicos e alguns parâmetros físico-químicos em suco de uva. Belo Horizonte, 2003. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

MARTÍN, J.; KUSKOSKI E. M.; NAVAS M. J.; ASUERO A. G. **Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments**. 2017. Disponível em <https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/antioxidant-capacity-of-anthocyanin-pigments>. Acesso em 10/02/2020.

MARTIN, K.; APPEL, C. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 2, p. 1–12, 2010.

MAYADAS, T.N.; CULLERE X.; LOWELL C.A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annu Rev Pathol**. v. 9, p. 181–218, 2014.

MAZZA, G. Anthocyanins and heart health. **Agri-Food Research Centre**. v. 43, n. 4. p.369-374, 2007.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. “Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome”. **Mediators of Inflammation**, vol. 2010, Article ID 289645, 10 pages, 2010.

MONTEIRO, C.A. The role of the transnational ultra-processed food industry in the pandemic of obesity and its associated diseases: problems and solutions. **World Nutr**. v. 10, n. 1, p. 89–99, 2019.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods**, v 65, n.1-2, p.55-63, Dec16 1983. ISSN 1078-0998 (Print) 1078-0998.

MUSIAL-MYSOCKA, A., KOT, M., MAJKA, M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. **Cell Transplantation**. p. 1-12, 2019.

O'KEEFE, J.H.; GHEEWALA, N.M.; O'KEEFE, J.O. Dietary strategies for improving post- prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 3, p. 249-55, jan. 2008.

PACCAUD, J.P.; SCHIFFERLI, J.A.; BAGGIOLINI, M. NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 166, n. 1, p. 187-92, 1990.

QIN Y, XIA M, MA J, HAO Y T, LIU J, MOU H Y, CAO L, LING W H. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. **Am J Clin Nutr** v. 90, p. 485–92, 2009.

RIEGER A. M., NELSON K. L., KONOWALCHUK J. D., BARREDA D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **J Vis Exp.** 2011 Apr 24;(50):2597. doi: 10.3791/2597.

ROSEN S.D.; BERTOZZI, C.R. The selectins and their ligands. **Curr Opin Cell Biol**, v. 6, p. 663–673, 1994.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantã.** v.20, p.315-28, 1947.

RUBIO-GUERRA, A.F.; VARGAS-ROBLES, H.; SERRANO, A.M.; LOZANO-NUEVO, J.J.; ESCALANTE-ACOSTA, B.A. Correlation between the levels of circulating adhesion molecules and atherosclerosis in type-2 diabetic normotensive patients: circulating adhesion molecules and atherosclerosis. **Cell Adhesion and Migration**, v. 3, n. 4, p. 369-72, oct. 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL. DW. Spectrophotometry of DNA or RNA. In: Sambrook J, Russel DW, editors. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3 edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: A8.20–8.1.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, & T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHURMANN G.M., BISHOP A.E., FACER P., VECCHIO M., LEE J.C., RAMPTON D.S., et al. Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease. **Gut.** Mar; 36(3):411-8, 1995.

SIMPSON, J.L.; PHIPPS S.; GIBSON P.G.; Inflammatory mechanisms and treatment of obstructive airway diseases with neutrophilic bronchitis. **Pharmacol Ther.** v. 124, p. 86–95, 2009.

SLAVIN, J.L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Adv Nutr.**, v. 3, p. 506-516, 2012.

SOGO, T., TERAHARA, N., HISANAGA, A., *et al.* Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3- sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin. **Biofactors.** v. 41, p. 58-65, feb 2015.

STEFANADI, E.; TOUSOULIS, D.; PAPAGEORGIOU, N.; BRIASOULIS, A.; STEFANADIS, C. Inflammatory biomarkers predicting events in atherosclerosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 16, p. 1690-707, 2010.

STRINGHETA P.C., VOLP A.C.P., OLIVEIRA T.T. Corantes naturais: usos e aplicações como compostos bioativos. In: COSTA, N.M.B, ROSA C.O.B.. **Alimentos Funcionais. Componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p.243-264.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n.1, p. 33-9, 2010.

TURNER, M. D. *et al.* Cytokines and chemokines: at the crossroads off cell signaling and inflammatory disease. **Biochimica et biophysica acta (BBA)** – molecular cell research, 2014.

WAGNER S., FLOOD T.A., O'REILLY P., SABOURIN L.A. Association of the Ste20-like kinase (SLK) with the microtubule. Role in Rac1-mediated regulation of actin dynamics during cell adhesion and spreading. **J Biol Chem**. Oct 4;277(40):37685-92, 2000.

WANNMACHER L; Obesidade como fator de risco para morbidade e mortalidade: evidências sobre o manejo com medidas não medicamentosas. **OPAS/OMS – Representação Brasil**. Brasília, 2016.

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

WHO – World Health Organization - Physical status: the use and interpretation of antropometry: report of a WHO expert committee. **WHO Technical Report Series**, Geneva, 1995.

WHO, World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet n. 311. Updated January 2015.

WHO – World Health Organization – Noncommunicable diseases country profiles, 2018.

XIA, M., *et al.* An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **The Journal of Nutrition**. v.136, nº. 8, p. 2220-2225, 2006.

YANG, Y.; SHI,Z.; REHEMAN, A., *et al.* Plant food Delphinidin-3-glisoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: novel protective roles against cardiovascular diseases. **Plosone**. v. 7, may 2012.

ZHAO, Y.; HE, X.; SHI, X.; HUANG, C.; LIU, J.; ZHOU, S.; HENG, C.K. Association between serum amyloid A and obesity: a meta-analysis and systematic review. **Inflammation Research**, v. 59, n. 5, p. 323-34, mai. 2010.



## ANEXO 1

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**TÍTULO:** Efeito da ingestão do suco de uva integral sobre a migração de leucócitos em mulheres com sobrepeso. Participação da delphinidina-3-glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular.

### **INTRODUÇÃO**

Estudos científicos sugerem que o excesso de gordura corporal pode ocasionar um estado crônico inflamatório, podendo alterar o perfil lipídico e a concentração sanguínea de alguns marcadores inflamatórios. Sabe-se hoje, que a inflamação é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 e das doenças cardiovasculares. A proposta deste estudo é avaliar se a ingestão de suco de uva integral tem a capacidade de atenuar a resposta inflamatória gerada pelo excesso de gordura corporal.

### **COMO É O ESTUDO?**

O participante do estudo consumirá durante 28 dias, 500 mL por dia de suco de uva integral. A quantidade total de garrafas do suco a serem consumidas durante todo o período de intervenção será fornecida aos participantes pelos pesquisadores após a assinatura deste termo. A entrega do suco de uva em domicílio será totalmente custeada pela pesquisa. Durante o estudo, ocorrerão três coletas de sangue, sendo a primeira antes da intervenção e as demais após 15 e 29 dias do início do consumo do suco de uva. O volume de sangue coletado em cada momento será de 30 mL, o qual será utilizado para avaliar a concentração de glicose, insulina, perfil lipídico, leptina, adiponectina, lipopolissacarídeos (LPS) e seus ligantes LBP e sCD14, biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, bem como avaliar microRNA e proteínas envolvidos na inflamação oriundos do plasma e de leucócitos. Nos três dias da coleta de sangue, o participante deverá entregar uma amostra de fezes, que será coletada pelo participante na sua residência por meio de coletor específico fornecido pelos pesquisadores, responder um questionário de frequência alimentar elaborado pelos pesquisadores e permitir a aferição do peso, estatura, circunferência da cintura e pressão arterial.

## OUTRAS INFORMAÇÕES

O participante não terá nenhum custo por participar da pesquisa.

Os riscos durante a participação deste estudo são a dor da picada da agulha no momento da coleta do sangue e, eventualmente, algum possível desconforto intestinal perante a ingestão do suco de uva. Em relação a picada, esta será realizada uma única vez em cada momento. Caso o senhor tenha algum problema em decorrência da coleta do sangue, os enfermeiros e técnicos do Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula de Souza estarão à disposição para ajudá-lo no que for preciso. Caso o participante tenha algum desconforto intestinal após a ingestão do suco de uva, o consumo do suco de uva deverá ser interrompido e o participante poderá optar por não dar continuidade à ingestão do suco. Sua participação é totalmente voluntária, podendo desistir e retirar seu consentimento a qualquer momento durante o decorrer da pesquisa.

Os benefícios potenciais em curto prazo são (i) o fornecimento de todos os resultados dos exames laboratoriais dos pacientes referente a cada uma das coletas de sangue supracitadas; e (ii) a ingestão de uma bebida com propriedades antioxidantes e anti- inflamatórias poderá propiciar redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis.

Os benefícios potenciais em longo prazo são (i) o fornecimento dos resultados referentes aos exames laboratoriais permitirá que os participantes tenham melhor controle da sua saúde; e (ii) a ingestão do suco de uva integral poderá representar uma alternativa saudável em substituição a outras bebidas que apresentam baixo valor nutricional.

Seus dados são secretos e sigilosos de acordo com as normas brasileiras. Os resultados desta pesquisa poderão ser publicados em revistas científicas, mas a sua identidade será preservada.

A qualquer momento o participante poderá esclarecer dúvidas por meio dos seguintes contatos:

- Prof .Dr.Marcelo Macedo Rogero–Investigador Principal: fone(11-3061-7850).
- Bruna Jardim Quintanilha - aluna de doutorado da Faculdade de Saúde Pública da USP: fone(11-3061-7850)

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP (11-30617779) que fica na Av. Dr. Arnaldo, 715 -

São Paulo - SP - Brasil - CEP - 01246-904. O horário de funcionamento do Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP é das 8h às 12h.

O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê interdisciplinar, constituído por profissionais de ambos os sexos, além de pelo menos um representante da comunidade. Este comitê tem como objetivo proteger o bem-estar de indivíduos que participam de pesquisas científicas, bem como orientar e regulamentar pesquisas e atividades práticas que envolvam intervenções com seres humanos, de modo a garantir e resguardar a integridade e os direitos dos sujeitos da pesquisa.

### **COMO PARTICIPAR?**

A participação neste estudo é inteiramente voluntária. Para isso o participante deve assinar esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, bem como o responsável por este estudo. As assinaturas devem ser realizadas em duas cópias. Uma fica com o participante e a outra fica com o responsável pela pesquisa.

Declaro que li o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo e aceito participar voluntariamente desse estudo. Ainda, declaro que recebi todos os esclarecimentos necessários para compreender o estudo e tive tempo suficiente para decidir minha participação no estudo.

**Nome Completo do Participante:**

---

**Assinatura do Participante:**

---

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Investigador:**

---

**Assinatura do Investigador:**

---

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_