

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

Influência da Cianidina como potencial modulador da capacidade
imunorregulatória das células-tronco mesenquimais

Sumara de Freitas

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2023

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

Influência da Cianidina como potencial modulador da capacidade
imunorregulatória das células-tronco mesenquimais

Sumara de Freitas

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

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

Freitas, Sumara de
P862i Influência da Cianidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória das células-tronco mesenquimais / Sumara de Freitas. - São Paulo, 2023. 109 p.

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

1. Cianidina. 2. Célula-tronco mesenquimal. 3. Imunorregulação. 4. Citocinas. 5. NF2B. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

Sumara de Freitas

Influência da cianidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória
das Células-tronco Mesenquimais

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____

Far better it is to dare mighty things, to win glorious triumphs, even though checkered by failure, than to take rank with those poor spirits who neither enjoy much nor suffer much, because they live in the gray twilight that knows not victory nor defeat.

Theodore Roosevelt

DEDICATÓRIA

À minha irmã, **Brenda**, a mais legal do mundo, por me apoiar e me incentivar em todos os momentos da minha vida.

À minha tia, **Rosilene**, por toda motivação, carinho e entusiasmo em tudo que faço.

A minha prima, **Marilene**, por sempre participar da minha vida e ser como uma mãe para mim.

Ao meu namorado, **Adalberto**, pelo carinho, apoio, por me incentivar nos momentos que perdi o ânimo e por toda paciência durante essa fase da minha vida.

DEDICATÓRIA

Ao Prof. **Dr. Ricardo Ambrósio Fock**, por ter aceitado em orientar-me. Pelos ensinamentos e pelo apoio no meu desenvolvimento científico.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome de seu diretor, Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz.

À Comissão de Pós-Graduação em Farmácia (CPG) da FCF-USP.

À Comissão Coordenadora de Programa (CCP) do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia, pela paciência e disponibilidade para ajudar.

À chefia do Departamento de Análises Clínicas (FBC) da FCF-USP.

À Prof. Dra. Primavera Borelli, por ser uma referência em hematologia e por todos os seus ensinamentos no laboratório e em sala de aula, além das contribuições que levarei para minha vida.

Aos professores Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, Dra. Karen Spadari Ferreira, e ao Dr. Emídio Marques de Matos Neto pelas suas contribuições durante o meu exame de qualificação.

Ao Edson Naoto Makiyama, técnico do Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental, pelo apoio técnico que foi imprescindível e pela amizade.

À Silene Migliorini, pelo apoio técnico, amizade, incentivo e pelos diversos momentos de descontração.

À Renata Chaves Albuquerque, pelo apoio técnico em relação à citometria.

À Bruna Roberta Oliveira Neves, amiga e mestra, que me apresentou o Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental, pela sua amizade desde a graduação, auxílio e incentivo ao longo dessa nova jornada.

Ao Carlos Eduardo da Silva Gonçalves, doutorando do Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental, pela sua amizade, auxílio e companheirismo em todas as etapas dessa fase.

Às demais amigas e companhias do Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental da FCF-USP, Juliana, Luciene, Rosana, Beatriz, Jeremias e Iolanda que fizeram parte da minha jornada e sempre contribuíram com algo para esse projeto.

À Kamilla da Costa Pantoja, pela ajuda ao disponibilizar as células necessárias para a última parte do projeto.

Aos meus amigos do Ensino Médio Everson e Sandra Lin, que me acompanharam e apoiam ao longo de todos esses anos, e a minha amiga Jess, pelos momentos de estudos, distrações e de voluntariado que tanto me ajudaram muito nessa etapa. Também a minha amiga Anne que sempre me apoiou e contribuiu para a concretização desse projeto de vida.

Ao Luiz Adriano Damasceno de Queiroz, aluno de doutorado, pelas dicas em várias etapas do projeto e pelos momentos de descontração.

Às secretarias do programa Elaine Midori, Edna Batista e a Samantha Luiza por toda ajuda prestada em todos os processos burocráticos.

À agência de fomento CNPq, pela concessão de bolsa (Processo 130475/2021-1).

As demais pessoas e professores que contribuíram no desenvolvimento desse projeto e na minha formação científica e pessoal.

Por fim, aos membros da banca pela contribuição ao lerem e discutirem esta dissertação.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

FREITAS, S. **Influência da cianidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória das Células-Tronco Mesenquimais**. 2023. 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2023.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são consideradas ferramentas promissoras para a terapia de diversas doenças, como neoplasias, doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas. Essas células possuem importante capacidade imunorregulatória, pois são capazes de modular a atividade de várias células do sistema imunológico e produzir fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Por outro lado, as antocianinas são pigmentos alimentares naturais que possuem propriedades bioativas, como ação anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana. Considerando a capacidade imunorregulatória das CTMs, este trabalho investigou se a cianidina-3-glicosídeo (CY3G), a antocianina mais comum e conhecida por sua capacidade anti-inflamatória, teria algum efeito sobre as características imunorregulatórias das CTMs. A linhagem celular murina C3H/10T1/2 (CCL-226™, ATCC®) foi cultivada e suplementada com 50µM de CY3G, sendo também estimulada com Lipopolissacarídeo (LPS). Esta dose foi escolhida com base na citometria de fluxo e nos ensaios de MTT. A análise da produção de citocinas por ensaio de ELISA revelou uma diminuição na produção de IL-1β, mas não foram observados dados significativos para IL-6, IL-10 e TGF-β. Houve aumento na produção de óxido nítrico (NO). Ao avaliar a expressão da proteína por Western blotting, observou-se redução na porção fosforilada do NFκB, mas não foram observadas alterações para PCNA e STAT3. A linhagem celular murina RAW 264.7 (TIB-71™, ATCC®) e linfócitos esplênicos de camundongos C57BL/6 foram cultivados na presença de meio condicionado C3H/10T1/2. Essas células RAW 264.7 exibiram uma produção significativamente menor de IL-1β, IL-6 e IL-12, enquanto os níveis de IL-10 não foram afetados. Em relação à expressão da proteína para NFκB, observou-se uma diminuição em sua porção fosforilada. Nos linfócitos esplênicos, houve diminuição da produção de IL-2 e aumento da produção de IL-10. Não foram observadas alterações significativas em relação à produção de IFN-γ em linfócitos esplênicos. Quanto à expressão da proteína NFκB entre os linfócitos esplênicos, não foram observadas alterações significativas quanto à sua fosforilação. Em conclusão, os dados aqui apresentados verificaram que o CY3G influenciou a capacidade imunorregulatória das CTMs promovendo um perfil imunossupressor, ao mesmo tempo em que modulava células do sistema imune.

Palavras-Chave: Cianidina, Célula-tronco mesenquimal, Imunorregulação, Citocinas, NFκB, Macrófagos, Linfócitos.

ABSTRACT

FREITAS, S. **Influence of Cyanidin as a potential modulator of the immunoregulatory capacity of Mesenchymal Stem Cells**. 2023. 109p. Dissertation (Master's Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2023.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are considered promising tools for the therapy of several diseases, such as neoplasms, autoimmune, inflammatory, and infectious diseases. These cells have a significant immunoregulatory capacity, as they are able to modulate the activity of various cells of the immune system and produce soluble factors, such as cytokines, chemokines, and growth factors. On the other hand, anthocyanins are natural food pigments that possess bioactive properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial action. Considering the immunoregulatory capacity of MSCs, this work investigated whether cyanidin-3-glucoside (CY3G), the most common anthocyanin and one known for its anti-inflammatory capacity, would have any effect on the immunoregulatory characteristics of MSCs. The murine cell lineage C3H/10T1/2 (CCL-226™, ATCC®) was cultured and supplemented with 50µM of CY3G, while also being stimulated with Lipopolysaccharide (LPS). This dose was chosen based on flow cytometry and MTT assays. Analysis of cytokine production by ELISA assay revealed a decrease in IL-1β production, but no significant data were observed for IL-6, IL-10, and TGF-β. There was an increase in the production of the immunomodulator nitric oxide (NO). When evaluating protein expression by Western blotting, a reduction in the phosphorylated portion of NFκB was observed, but no changes were observed for PCNA and STAT3. The murine cell lineage RAW 264.7 (TIB-71™, ATCC®) and splenic lymphocytes from C57BL/6 mice were cultured in the presence of C3H/10T1/2 conditioned media. These RAW 264.7 cells displayed a significantly lower production of IL-1β, IL-6, and IL-12 while IL-10 levels were not affected. Regarding the protein expression for NFκB, a decrease in its phosphorylated portion was observed. In splenic lymphocytes, there was a decrease in the production of IL-2 and an increase in the production of IL-10. No significant changes were seen regarding the production of IFN-γ in splenic lymphocytes. As for the protein expression of NFκB among splenic lymphocytes, no significant changes were seen regarding its phosphorylation. In conclusion, the data shown here verified that CY3G influenced the immunoregulatory capacity of MSCs by promoting an immunosuppressive profile, while also modulating cells of the immune system.

Keywords: Cyanidin, Mesenchymal Stem Cell, Immunoregulation, Cytokines, NFκB, Macrophages, Lymphocytes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL.....	21
2.1.1	Célula-tronco mesenquimal: aspectos imunoregulatórios.....	23
2.2	VIA DE SINALIZAÇÃO DO NFκB ATIVADO PELO LPS	28
2.3	CIANIDINA.....	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	CULTURA DA LINHAGEM C3H/10T1/2.....	36
4.1.1	Padronização da dose por ensaio de MTT.....	38
4.1.2	Avaliação da viabilidade das CTM por Citometria de Fluxo	39
4.1.3	Avaliação do ciclo celular das CTMs por Citometria de Fluxo	40
4.1.4	Suplementação dos cultivos com cianidina e geração dos ‘meios condicionados’	41
4.1.5	Avaliação de citocinas produzidas por CTMs	41
4.1.6	Avaliação da produção de NO por ensaio de Griess	42
4.1.7	Determinação da Expressão de NFκB, STAT3 e PCNA.....	42
4.1.7.1	SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	42
4.1.7.2	Preparo de gel de poliacrilamida	42
4.1.7.3	Preparo de lisado de proteína	43
4.1.7.4	Transferência de proteína do gel para a membrana (Nitrocelulose).....	43
4.1.7.5	Sondagem das proteínas com anticorpos.....	43
4.1.7.6	Revelação com sistema quimioluminescente	44
4.1.8	Efeito meio condicionado de CTM sobre a produção de citocinas e expressão de NFκB de células monocíticas	45
4.1.9	Efeito meio condicionado de CTM sobre a produção de citocinas e expressão de NFκB de células linfocíticas.....	47
4.1.10	Análise Estatística	48
5	RESULTADOS.....	49

5.1	ANÁLISE DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CIANIDINA PELO ENSAIO DE MTT PARA DEFINIÇÃO DA DOSE	49
5.1.1	Análise de viabilidade e apoptose das CTMs cultivadas com o estímulo de cianidina	50
5.1.2	Avaliação do ciclo celular das CTMs cultivadas com o estímulo de cianidina	52
5.1.3	Análise da influência da cianidina na síntese de mediadores solúveis pelas CTMs	53
5.1.4	Análise da produção de NO pelas CTMs	55
5.1.5	Análise da influência da cianidina na expressão proteica de NFκB, STAT-3 e PCNA pelas CTMs	56
5.1.6	Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre a produção de IL-1β, IL-6, IL-10 e IL-12 de células da linhagem RAW 264.7	58
5.1.7	Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre o a expressão de NFκB de células da linhagem RAW 264.7	60
5.1.8	Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre o a produção de IL-2, IL-10 e IFN-γ de células linfóides esplênicas	61
5.1.9	Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre o a expressão de NFκB de células linfóides esplênicas	62
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	74
8	REFERÊNCIAS	75
9	ANEXOS	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
APC	Células apresentadoras de antígeno
ARPE-19	Células epiteliais pigmentares da retina humana
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
CCL2	Proteína quimiotática de monócito 1
CD	Grupamento de diferenciação
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COL10A1	<i>Collagen type X alpha-1</i>
COL2A1	<i>Collagen type II alpha 1</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
CY3G	Cianidina-3-glicosídeo
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DC	Células dendríticas
DMEM	Meio Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA.hy926	Células endoteliais vasculares humanas imortalizadas
ELISA	Ensaio imunosorbente ligado à enzima
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G-CSF	Fator estimulante de colônias granulocítica
GM-CSF	Fator estimulante de colônias grânulo-monocíticas
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HHE	<i>4-hidroxihexanal</i>
HLA-I	Antígenos leucocitários humanos de classe I
HLA-II	Antígenos leucocitários humanos de classe II
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1

ICAM-2	Molécula de adesão intercelular-2
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN-γ	Interferon- γ
IKK	Quinase I κ B
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IκB	Proteína inibidora κ B
JAK-STAT	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
M-CSF	Fator de crescimento de macrófagos
MHC I	Molécula do complexo de histocompatibilidade principal classe I
MHC-II	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe II
miRNA	microRNA
MMP-2	Metaloproteinase de matriz -2
mRNA	RNA mensageiro
MTT.	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazólio
NED	N-naftiletilenodiamina
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa-B
NK	<i>Natural killer</i>
NLRP3	<i>NRL Family Pyrin Domain Containing 3</i>
NO	Óxido nítrico
OH	Hidroxila
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução tampão fosfato salina
PCNA	Antígeno nuclear em proliferação celular
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PGE₂	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídio
PRRs	Receptores de reconhecimento de patógenos

RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SBF	Soro bovino fetal
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS	Sódio dodecil sulfato
SOX9	<i>Sry-related hmg-box gene 9</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT3	Sinal de transdução e ativação de transcrição-3
TGF-β	Fator de transformação do crescimento- β
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
TLR-4	<i>Receptor Toll-like-4</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
Tregs	Linfócitos T reguladores
USP	Universidade de São Paulo
VCAM	Molécula de adesão de célula vascular-1

LISTA DE SÍMBOLOS

α - letra grega alfa

β - letra grega beta

κ - letra grega kappa

γ - letra grega gama

ϵ - letra grega épsilon

μ - letra grega mi

®- marca registrada usada no Brasil

™- marca registrada (*trademark*)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Critérios para isolamento de CTMs	22
Figura 2 - Papel imunorregulatório das CTMs com atuação tanto da imunidade inata e da adaptativa.....	24
Figura 3 - A atuação das CTMs para manter um equilíbrio imunológico.	26
Figura 4 - A via de sinalização do fator de transcrição NFκB.....	29
Figura 5 - As diversas atuações do fator de transcrição NFκB.....	31
Figura 6 - Estrutura química da CY3G.....	33
Figura 7 - Fotomicrografia de células da linhagem C3H/10T1/2.....	36
Figura 8 - Esquematização dos grupos analisados com a linhagem CTM.	38
Figura 9 - Fotomicrografia de células da linhagem Raw 264.7.....	45
Figura 10 - Esquematização dos grupos analisados com a linhagem Raw 264.7	46
Figura 11 – Esquematização dos grupos analisados com os linfócitos esplênicos.....	48
Figura 12 - Viabilidade das células CTMs pelo ensaio de MTT	50
Figura 13 - Viabilidade e apoptose das células CTMs por Citometria de Fluxo.....	51
Figura 14 - Ciclo celular das células CTMs por Citometria de Fluxo.....	52
Figura 15 – Dosagem de citocinas no sobrenadante de CTMs pelo ensaio de ELISA	54
Figura 16 - Dosagem de NO no sobrenadante das CTMs pelo ensaio de Griess	55
Figura 17 - Expressão proteica na linhagem CTMs por <i>Western blotting</i>	57
Figura 18 - Produção de citocinas do sobrenadante de células Raw 264.7	59
Figura 19 - Expressão de NFκB fosforilado e total na linhagem Raw 264.7 por <i>Western blotting</i>	60
Figura 20 - Produção de citocinas do sobrenadante de linfócitos esplênicos.....	61
Figura 21 - Expressão de NFκB fosforilado e total em linfócitos esplênicos por <i>Western blotting</i>	63

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente, muitas doenças crônicas estão ligadas à inflamação, o que está relacionado ao envelhecimento da população global e associadas com o modo de vida e diversos fatores de risco como sedentarismo, dieta inadequada, tabagismo entre vários outros (FURMAN et al., 2019). Estudos sobre inflamação são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento de doenças inflamatórias. Um dos enfoques atuais é a imunoterapia com células-tronco mesenquimais (CTMs)(KARUNAKARAN et al., 2021; KOT et al., 2019; MUSIAL-WYSOCKA; KOT; MAJKA, 2019).

Atualmente, as células-tronco mesenquimais (CTMs) estão sendo amplamente utilizadas em pesquisa ao redor do mundo, nos Estados Unidos temos vários estudos clínicos, atuando no tratamento de várias doenças crônicas (COFFMAN et al., 2019; KNYAZEV; KAGRAMANOVA; PARFENOV, 2022). No Brasil, temos vários estudos com testes clínicos sendo conduzidos com o enfoque nas CTMs (SENEGAGLIA et al., 2021; TOBIN et al., 2013).

As CTMs desempenham um papel regulador fundamental, pois são capazes de modular tanto as respostas inflamatórias quanto as respostas imunossupressoras. Essas células desempenham um papel importante na reparação de lesões, danos celulares e teciduais no organismo (BULATI et al., 2020; RAGNI et al., 2020). Além disso, interagem com diversas células efetoras do sistema imunológico, seja por meio de contato direto ou indireto, e liberam diversos mediadores, como fatores solúveis, citocinas e quimiocinas (JAFRI et al., 2020).

A cianidina, um tipo importante de antocianina encontrada na dieta em alguns alimentos de origem vegetal, oferece diversos benefícios para o organismo (MAZZA, 2017). Ela desempenha um papel essencial como moduladora da resposta imune, induzindo um perfil imunossupressor que ajuda a controlar os níveis de citocinas inflamatórias e seus mediadores. Além disso, a cianidina possui propriedades antioxidantes e outras características benéficas (DZHANFEZOVA et al., 2020; TORABIAN et al., 2019; WANG; STONER, 2008).

Embora as CTMs estejam sendo utilizadas no desenvolvimento de diversas terapias, resta a questão de como potencializar sua ação, especialmente em relação à regulação imunológica. Neste trabalho, buscamos avaliar o impacto da cianidina na ação imunorregulatória das CTMs e sua influência sobre outras células do sistema imunológico.

Dessa forma, buscamos compreender melhor como a cianidina pode modular as CTMs e seus efeitos na regulação imunológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL

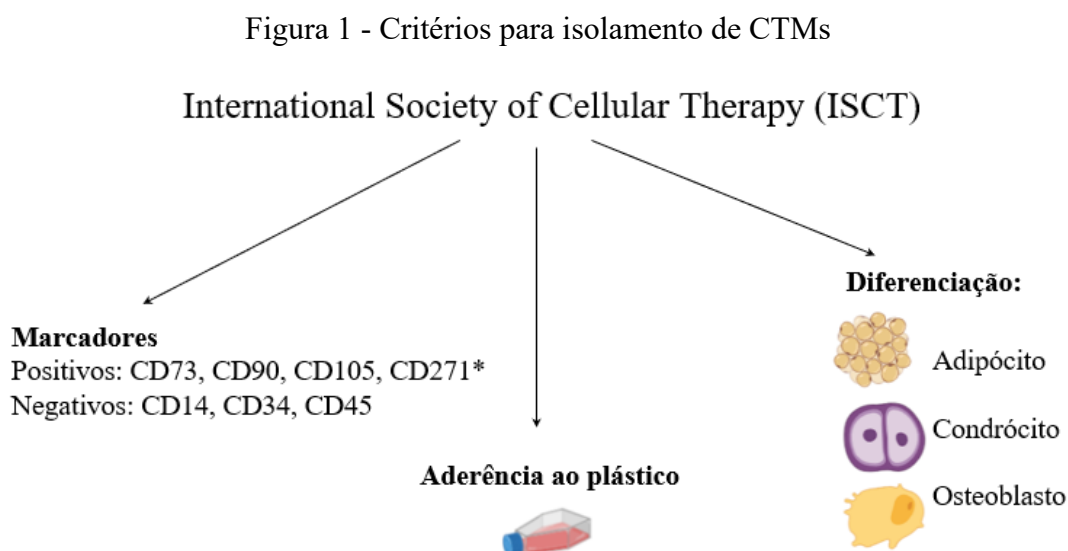
As células tronco mesenquimais (CTMs) têm atraído cada vez mais atenção devido sua grande capacidade terapêutica, que englobam: imunorregulação, regulação da inflamação, reparo e homeostasia tecidual (REGMI et al., 2021; YAMADA et al., 2022; ZHANG et al., 2023). Entretanto, os conhecimentos relacionados a essa célula são relativamente recentes (CAPLAN, 1991).

Os conceitos de hematopoese e de célula-tronco hematopoética foram estabelecidos pelo pesquisador russo Alexander Maximow (1874-1928) sendo postulado que todas as células sanguíneas provem da mesma célula ancestral (MAXIMOW, 1924). A partir desses achados, estudos pioneiros relacionados as células-tronco mesenquimais foram realizadas em meados da década de 70 por Friedenstein (1924 -1998), o qual demonstrou que a medula óssea continha células precursoras não - hematopoéticas, bem como, possuíam características clonogênicas, com morfologia fibroblastóides, com alta aptidão para replicação *in vitro* e com alta capacidade de diferenciação celular (FRIEDENSTEIN et al., 1974; V; ELENA; R, 2009).

Assim, as CTM são células que atuam com grande importância nos processos de renovação tecidual do organismo, atualmente sabe-se que essas células não são restritas a medula óssea, podendo ser encontradas na maioria dos tecidos celulares do organismo como: medula óssea, tecido adiposo, placenta, polpa dental e muitos outros (BARRY; MURPHY, 2004; HE et al., 2019; WANG et al., 2020). Apresentando assim diferentes capacidades e características de acordo com a origem da CTMs (KAVIANI et al., 2019).

Essas células já tiveram diversas nomenclaturas, contudo a nomenclatura que está mais difundida atualmente é a de célula-tronco mesenquimal (CAPLAN, 2010, 2017). Além disso, como as CTM são encontradas na maioria dos tecidos, foram necessários estabelecer critérios para definir essas células. Atualmente foram postulados critérios pelo *The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the Internacional Society for Cellular Therapy* que devem ser levados em consideração ao se fazer estudos com essas células como: aderência ao plástico, capacidade de diferenciação, expressão de marcadores baseados em Grupo de

diferenciação (CD) como CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105, além da ausência de marcadores de linhagem hematopoética positiva conforme a Figura 1 (BARRY; MURPHY, 2004; DOMINICI et al., 2006; WITWER et al., 2019).



Critérios mínimos para isolamento de CTMs de acordo com a *International Society of Cellular Therapy (ISCT)*. A figura foi feita utilizando BioRender®. Fonte: Autoria própria, 2021.

As CTMs são células encontradas na medula óssea e apresentam uma morfologia fusiforme e fibroblastóide. Estas células tem a capacidade de transformar-se nas células que compõem o estroma medular, tendo uma grande importância e influência na composição do microambiente hematopoético (HOCKING; GIBRAN, 2010). Essas células representam uma fração de 0,01 a 0,001% das células nucleadas totais presentes na medula óssea (MELIEF et al., 2013). Essas células podem transdiferenciar-se em células endodérmicas, mesodérmicas e neuroectodérmicas que apresentando os fenótipos funcionais das mesmas (EGEA et al., 2011).

As CTMs são células capazes de uma confecção intensa de exossomos podendo assim ser utilizado para a entrega de fármacos (GUO et al., 2019; YEO et al., 2013). Os exossomos são um tipo de vesículas extracelulares formados da bicamada lipídica apresentando de 30 a 200nm de diâmetro de origem endossomal (KALLURI; LEBLEU, 2020). Essas estruturas formadas a partir de CTM são ricas em RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA), além disso, essas estruturas são consideradas úteis para o uso em diversas modalidades terapêuticas atuando em doenças como autismo, diabetes, doença de Parkinson e em diversos tipos de câncer

(BAGHERI et al., 2020; BISWAS et al., 2019; CHEN et al., 2020a; PERETS et al., 2018; SHARMA et al., 2021).

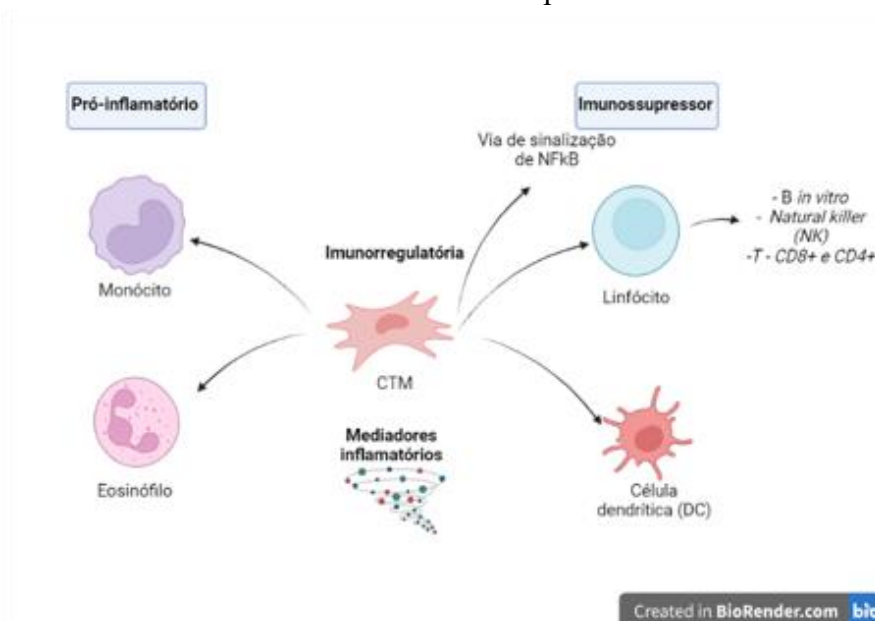
A CTM tem diversas propriedades biológicas que podem ser benéficas para o organismo como atividade anti-inflamatória, anti-apoptótica, anti-tumoral, anti-microbiana, propriedades regenerativas e proliferativas (BONFIELD et al., 2021; MANDAL et al., 2019; RAGNI et al., 2020; XIA et al., 2019; ZHANG et al., 2019a). Vários estudos têm considerado as CTMs como uma ferramenta promissora na terapia celular pela sua grande capacidade imunorregulatória, uma vez que estas células são capazes de modular as funções de células do sistema imune e ainda produzem fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e angiopoietinas (JAFRI et al., 2020; LIU et al., 2022, 2021a).

Mesmo com as suas grandes capacidades terapêuticas não podemos desconsiderar a eficiência insuficiente apresentada em algumas terapias *in vivo* (REGMI et al., 2021). A capacidade imunorregulatória dessas células é um dos pontos cruciais nos tratamentos de doenças ou desordens autoimunes e são o ponto chave de sua capacidade terapêutica, por isso, a necessidade de estudar como melhorar/potencializar a capacidade imunorregulatória dessas células.

2.1.1 Célula-tronco mesenquimal: aspectos imunoregulatórios

As CTMs possuem capacidade de modular diversas reações imunes, incluindo a liberação de citocinas e fatores de crescimento como Fator estimulante de colônias granulocítica (G-CSF), fator estimulante de colônias grânulo-monocíticas (GM-CSF), Fator de crescimento de macrófagos (M-CSF), Stem cell factor (SCF), Interleucina (IL-6), IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15 (BULATI et al., 2020; CHINNICI et al., 2019). Esses estímulos, ou fatores solúveis modulam as funções de várias células imunes, incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos, células *Natural killer* (NK), Células dendríticas (DC) e neutrófilos, além de estimular a proliferação dessas células em casos de processos inflamatórios (CHINNICI et al., 2019; LI; HUA, 2017) conforme a Figura 2.

Figura 2 - Papel imunorregulatório das CTMs com atuação tanto da imunidade inata e da adaptativa



O papel imunorregulatório da CTM envolve sua atuação com células da imunidade inata e adaptativa além de diversos fatores solúveis como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Fonte: (Adaptado de CHINNICI et al., 2019; ENGLISH et al., 2009; LI; HUA, 2017; NAJAR et al., 2010). A figura foi feita utilizando BioRender®.

As CTMs apresentam diversas moléculas de adesão, tais como Molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), Molécula de adesão intercelular-2 (ICAM-2) e Molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM) (NAUTA et al., 2006; RAHBARGHAZI et al., 2019). No que diz respeito ao sistema imunológico, essas células apresentam e expressam Antígenos leucocitários humanos de classe I (HLA-I) na sua superfície, mas não apresentam Antígenos leucocitários humanos de classe II (HLA-II) e nem moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86 (KOT et al., 2019; TSE et al., 2003; WANG et al., 2019b). Adicionalmente, elas expressam baixos níveis de Molécula do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC I) e pouca ou nenhuma expressão de Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC-II) (BARRACHINA et al., 2020; CHEN et al., 2020b; FIBBE; NOORT, 2003).

Sabe-se que a plasticidade imunológica das CTM está diretamente relacionada aos estímulos presentes no microambiente em que elas se encontram (WANG et al., 2014). Na presença de citocinas como Interferon- γ (IFN- γ) ou Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), essas

células adquirem características imunossupressoras. A imunossupressão pode ocorrer por meio do contato célula-célula e da liberação de fatores solúveis pelas CTMs, que são mediados por diferentes moléculas, como Prostaglandina E₂ (PGE₂), Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), Óxido nítrico (NO), IL-27, Fator de transformação do crescimento-β (TGF-β) e diversas outras moléculas (ALMEIDA-PORADA; ATALA; PORADA, 2020; LEE; JUNG; KIM, 2021; ZHANG et al., 2019b).

A CTM exerce um papel muito importante na modulação das reações imunes, sendo responsável por liberar diversos fatores solúveis que atuam na regulação das funções das células do sistema imune. A secreção de IL-6, M-CSF e PGE₂ pelas CTM pode inibir a diferenciação e maturação das DCs, diminuindo a expressão de moléculas co-estimulatórias e alterando o perfil de produção de citocinas (ABBASI-KENARSARI et al., 2020; ORTIZ-VIRUMBRALES et al., 2020; SHAHIR et al., 2020). As CTMs também podem inibir a proliferação e a sobrevivência das células NK por meio da produção de IDO, TGF-β e PGE₂, e pela ação citotóxica exercida pelo contato célula-célula (LYNCH et al., 2020; SHOKRI et al., 2019).

As CTM também têm um impacto sobre as células da imunidade adaptativa. Elas atuam na inibição da ativação da célula T, acompanhada ou não pelo aumento de Linfócitos T reguladores (Tregs) (BOLANDI et al., 2020; REGMI et al., 2019). Essa supressão dos linfócitos pode ocorrer mediante a modulação das Células apresentadoras de antígeno (APC), como as DCs, que levam à alteração na expressão de citocinas e aumento na apresentação de antígenos. As CTM de diferentes tecidos também são capazes de suprimir a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (ENGLISH et al., 2009; NAJAR et al., 2010). Em geral, a ação anti-inflamatória e imunossupressora das CTM é exercida por meio da modulação de diversas células imunes, o que confere a essas células um papel importante na manutenção da homeostase do sistema imune.

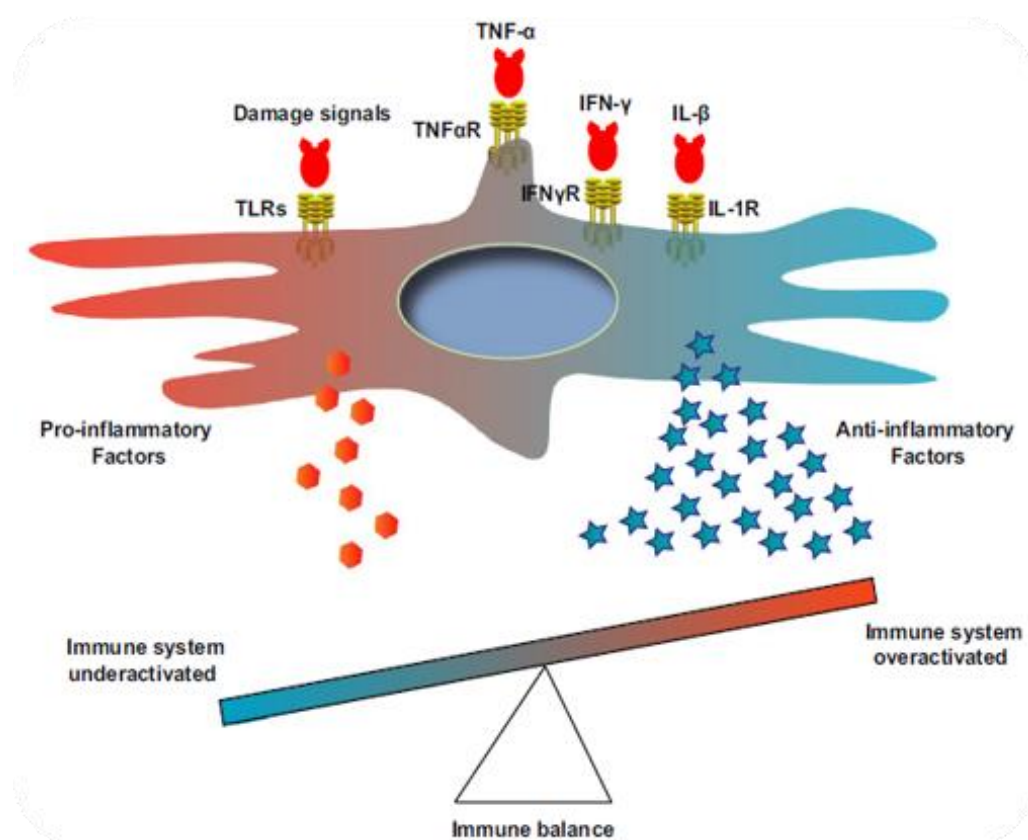
Há evidências conflitantes em relação ao efeito das CTMs sobre a proliferação de linfócitos B *in vitro* (MAGATTI et al., 2020). Embora alguns estudos sugiram que as CTMs possam inibir a proliferação das células B, outros demonstram que as CTMs são importantes para a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células B secretoras de antígenos em humanos (CHENG et al., 2019; TAGO et al., 2021). A divergência pode estar relacionada às diferenças nas condições experimentais utilizadas para isolar as células.

Os linfócitos B também são modulados pelas CTMs, tanto pelo contato direto célula-célula quanto por fatores solúveis, assim como ocorre com os linfócitos T. Acredita-se que a

modulação seja mediada pelo TGF- β produzido pelas CTMs e pelas interações entre o *Programmed cell death protein 1* (PD-1) e seus ligantes, este expresso pelos linfócitos T ativados (NI et al., 2018; WU et al., 2020a). As CTMs possuem uma subpopulação produtora da citocina IL-17 que atua de forma autócrina, ativando a via de sinalização do Fator de transcrição nuclear kappa-B (NF κ B), o que inibe a produção de TGF- β pelas CTMs e prejudica, assim, sua função imunossupressora (YANG et al., 2013). Além disso, as CTMs são capazes de inibir a diferenciação e a expressão constitutiva dos receptores de quimiocinas (CUESTA-GOMEZ; GRAHAM; CAMPBELL, 2021).

Para analisar o equilíbrio entre o perfil pró e anti-inflamatório das CTMs, é necessário considerar os diferentes estímulos que as ativam conforme a Figura 3.

Figura 3 - A atuação das CTMs para manter um equilíbrio imunológico.



A atuação das CTMs para manter um equilíbrio imunológico. As CTMs atuam dependendo da necessidade provendo um perfil pró-inflamatório e em outras condições promove um perfil imunossupressor. Fonte: (JIANG; XU, 2020)

Por exemplo, a presença de danos, lesões ou infecções, detectados por receptores de padrão como Padrões moleculares associados a danos (DAMP) e Padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), podem induzir a liberação de substâncias como IL-6, IL-8 e IL-1, que favorecem um perfil pró-inflamatório (COCHET; PERI, 2017; KURTE et al., 2020). Por outro lado, a liberação de PGE₂, induzida pelo contato celular e dependente de Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), pode inibir diretamente a proliferação de Linfócito T *helper* 17 (Th17) e a diferenciação e maturação DCs, além de promover a liberação de citocinas como IL-10 e TGF-β1, que têm um papel importante no controle negativo das reações inflamatórias (JIANG; XU, 2020; SUZDALTSOVA et al., 2022; TATARA et al., 2011).

No que se refere à regulação da resposta adaptativa, a CTM libera uma série de fatores solúveis, incluindo PGE₂, TGF-β, IL-10, Fator de crescimento de hepatócitos (HGF), NO e PD-1, que atuam sobre a polarização de linfócitos T CD4⁺ para Linfócitos T *helper* 1 (Th1) e Th17 e suprimem a sua proliferação (HERMANKOVA et al., 2016; PREVOSTO et al., 2007; RAO et al., 2020). Além disso, na presença de citocinas inflamatórias, as CTMs induzem a produção de NO pelos linfócitos T CD8⁺, o que reduz sua citotoxicidade, proliferação e produção de citocinas (LE BLANC et al., 2004; PREVOSTO et al., 2007). Em relação à imunidade humoral, a liberação de fatores solúveis e PD-1/*Programmed cell death ligand 1* (PD-L1) pela CTM induz a redução da ativação, diferenciação, expressão dos receptores de quimiocina e proliferação dos linfócitos B (LIU; LIU; CHEN, 2020; LUZ-CRAWFORD et al., 2012; SCHENA et al., 2010).

Uma das vias de atuação imunossupressora das CTMs é a via do NFκB, que é ativada em ações pró-inflamatórias e está relacionada à ativação de macrófagos para a síntese de fatores como IL-1 e TNF-α (CHOU; HO; HUNG, 2022; DORRONSORO et al., 2014). Além disso, a ativação da via Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) está associada ao equilíbrio entre a imunidade inata e adaptativa e é ativada por uma variedade de interferons e citocinas (JI et al., 2017; SHABBIR et al., 2010). Embora haja quatro tipos de JAKs e sete STATs em mamíferos, suas funcionalidades podem mudar de acordo com as diversas linhagens celulares e citocinas que recebem o sinal de cascata de sinalização semelhante que têm o potencial de apresentar perfis diferentes e assim a Sinal de transdução e ativação de transcrição-3 (STAT3) está associada com a rede de pluripotência (KIM et al., 2019; VILLARINO et al., 2015).

As CTMs podem ser utilizadas em terapias para tratamentos associados ao sistema imune, diabetes tipo I, infarto do miocárdio, defeitos nos músculos esqueléticos, trauma cerebral, Alzheimer e neoplasias, entre outros (BUSCHHAUS et al., 2022; FREITAG et al., 2019; GONDALIYA et al., 2022; MALVICINI et al., 2022; PINHO et al., 2022; WANG et al., 2022). Há diversos testes clínicos em que as CTM são utilizadas por estarem mais associadas em terapias celulares, como estudos que as relacionam com fatores epigenéticos que atuam nas células-tronco e induzem sua diferenciação (LIAO et al., 2021; MORTADA; MORTADA, 2018). Demais estudos recentes na área de medicina regenerativa sugerem que os exossomos provenientes das CTMs podem ser uma importante e promissora terapia (LIU et al., 2021a; SHARMA et al., 2021). Entretanto, ainda há muito a ser estudado sobre o potencial terapêutico da célula-tronco mesenquimal.

2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO DO NFκB ATIVADO PELO LPS

Em 1986, foi descoberto o NFκB, um fator de transcrição que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo das células B (κB) (SEN; BALTIMORE, 1986). Sua função mais bem estudada é na resposta imunológica, regulando a expressão de genes envolvidos em processos essenciais como inflamação, proliferação, crescimento celular, sobrevivência e apoptose (BARKETT; GILMORE, 1999; JANA et al., 2017; YU et al., 2020).

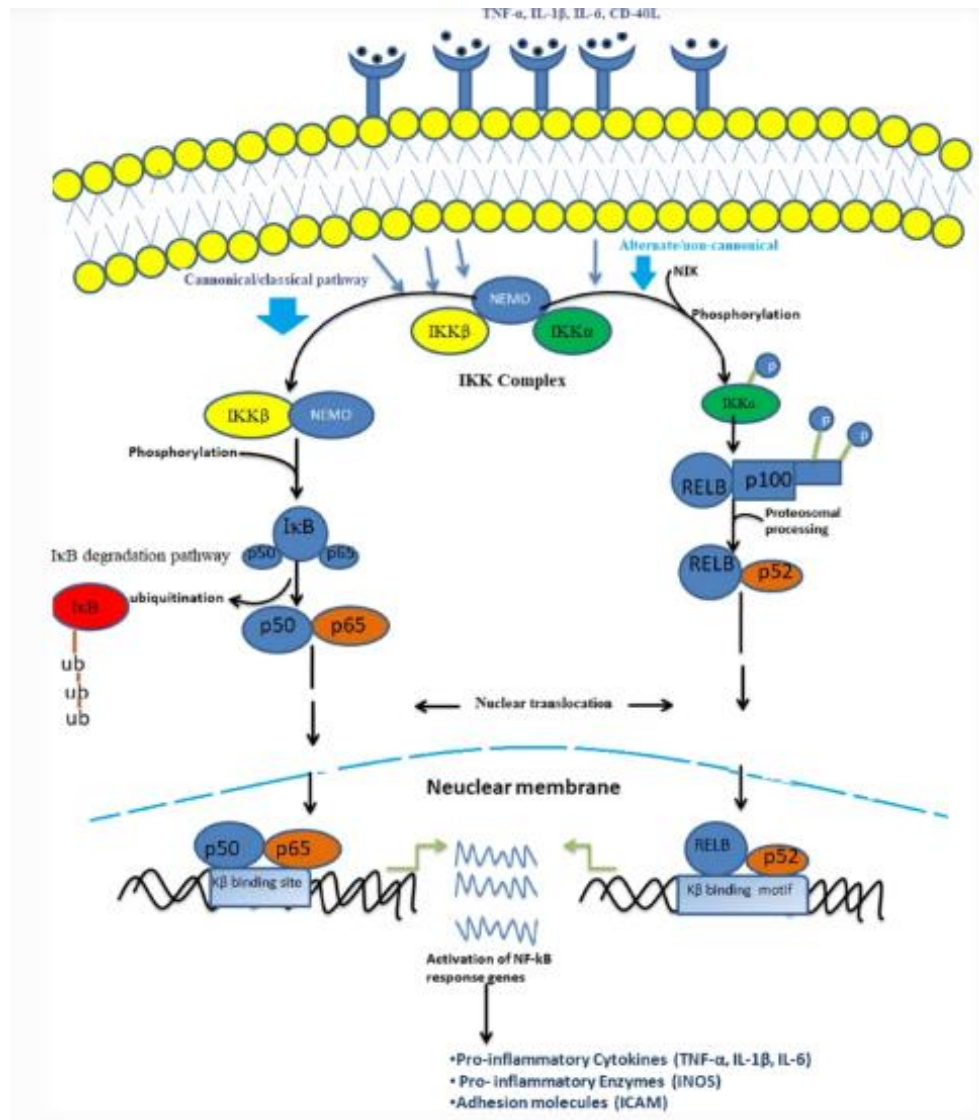
A ativação dessa via ocorre em situações de desequilíbrio ou estresse, através de Receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que reconhecem PAMPs. Um exemplo notável de estímulo é o Lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias gram-negativas que é reconhecido pelo Receptor *Toll-like-4* (TLR-4) presente na membrana plasmática (COCHET; PERI, 2017; KURTE et al., 2020).

O NFκB, fator de transcrição que regula a expressão de genes em resposta a uma variedade de estímulos, é constituído por heterodímeros ou homodímeros pertencentes à família Rel de proteínas de ligação ao Ácido desoxirribonucleico (DNA). Em mamíferos, o NFκB é composto por RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 ou p105 (precursor de p50) e NFκB2 ou p100 (precursor de p52) (HAYDEN; GHOSH, 2008). A atividade do NFκB é controlada pela Proteína inibidora κB (IκB), que inclui Bcl-3, IκBα, IκBβ, IκBγ e IκBε. Quando inativo, o NFκB está

ligado à I κ B, mas pode ser ativado por várias citocinas, moléculas inflamatórias e sinais de estresse (HAYDEN; GHOSH, 2008).

O NF κ B pode ser ativado por distintas vias moleculares como: a via canônica (via de ativação clássica) ou pela via não-canônica (via de ativação alternativa) conforme a Figura 4 .

Figura 4 - A via de sinalização do fator de transcrição NF κ B



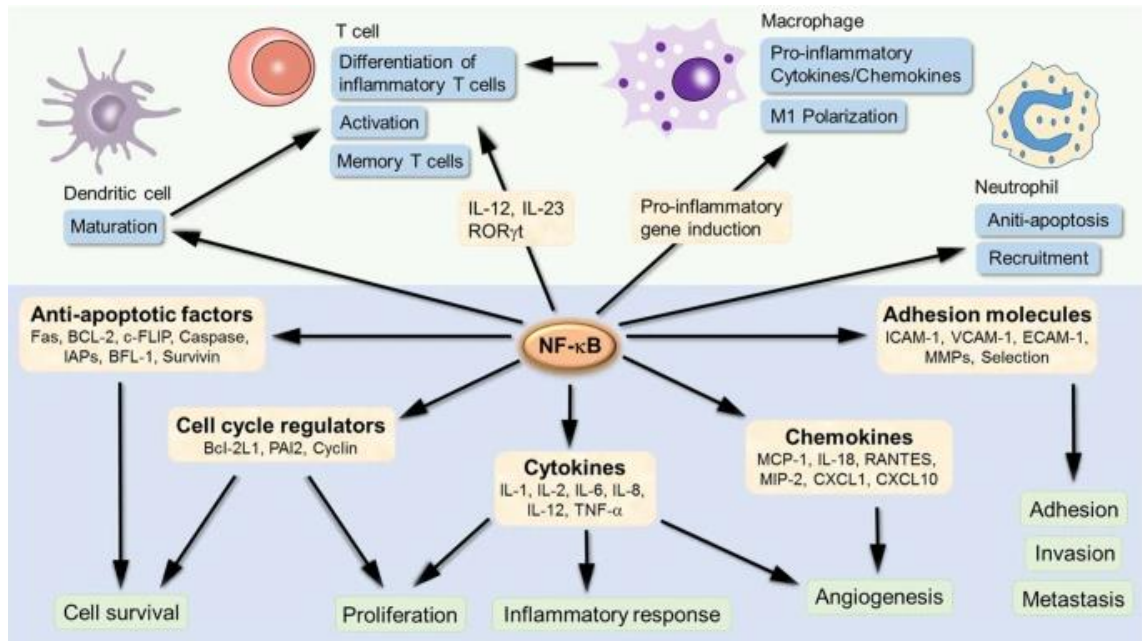
A via de sinalização do fator de transcrição NF κ B. A via do fator de transcrição NF κ B pode ser ativada de forma canônica e não-canônica. Fonte: (SINGH et al., 2020)

A via canônica de NFκB é composta pelos dímeros RelA (p65), c-Rel e NFκB1 ou p105 (precursor de p50) (SUN, 2017). Essa via é ativada por citocinas pró-inflamatórias, infecções bacterianas e virais, bem como por processos que geram estresse celular. A ativação ocorre por meio da fosforilação de IκB pela Quinase IκB (IKK), seguida de ubiquitinação e degradação da IκB no citoplasma. Além disso, proteínas adaptadoras e ancoradoras também estão presentes no citoplasma. Com a degradação de IκB, os dímeros de NFκB são liberados e translocam para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas e ativam a transcrição gênica associada a vários processos biológicos (ZHANG et al., 2021b).

A via não-canônica de NFκB é formada pelos dímeros RelB e NFκB2 ou p100 (precursor de p52). Essa via está associada à expressão de genes relacionados com o desenvolvimento e a conservação de órgãos linfóides (SUN, 2017; TRARES; ACKERMANN; KOCH, 2022).

O fator de transcrição NFκB regula diversas funções no organismo, incluindo a produção de diversas citocinas como IL-1, IL-6 e TNF-α, que possuem um perfil inflamatório, reguladores do ciclo celular (ciclinas), quimiocinas (CXCL1 e CXCL10), fatores anti-apoptóticos (caspases) e moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) (LIU et al., 2017) conforme a Figura 5.

Figura 5 - As diversas atuações do fator de transcrição NFκB



As diversas atuações do fator de transcrição NFκB. O NFκB está associado com várias funções como fatores anti-apoptótico, reguladores do ciclo celular, citocinas quimiocinas, moléculas de adesão e atuação com diversas células do sistema imune. Fonte: (LIU et al., 2017)

Estudos indicam que o fator de transcrição NFκB tem sua atuação inibida quando estimulado por diversos fitoquímicos e em diferentes condições patológicas. Alguns exemplos incluem o cardamomo (RUIBIN; BO; DAYNING, 2020), curcumina (CHOWDHURY et al., 2019), genisteína (YUAN et al., 2019), kaempferol (QU et al., 2021), quercetina (XIONG et al., 2019), e resveratrol (ZHAO et al., 2021) e diversas outras como as antocianinas (ABOONABI; ABOONABI, 2020).

2.3 CIANIDINA

As antocianinas são um conjunto de pigmentos naturais das cores vermelho, roxo e azul. Apresentam caráter hidrossolúvel, presentes em várias frutas, flores, alguns vegetais e plantas (MAZZA, 2017; PRINSI et al., 2020; SU et al., 2019b). O nome Antocianina vem do Grego *anthos*, que significa flor e da palavra grega *kyanos*, que significa azul, essa nomenclatura era usada para descrever o pigmento azul da planta Centáurea (*Centaurea cyanus*) (STRACK; WRAY, 1989). Elas pertencem à classe dos flavonóides, que são um subgrupo de polifenóis amplamente consumidos na dieta (KONG et al., 2003).

No entanto, as antocianinas são substâncias instáveis, reativas e altamente sensíveis a variações de condições ambientais e químicas, como mudanças na quantidade de oxigênio, variações de Potencial hidrogeniônico (pH), flutuações de temperatura, ácido ascórbico, dióxido de enxofre, íons metálicos, exposição à luz e ação proteolítica (QIU et al., 2018; TONG et al., 2020). Devido a isso, é difícil manter a estabilidade das antocianinas para preservar suas propriedades benéficas e impedir a sua degradação (QIU et al., 2018; TONG et al., 2020).

As antocianinas, estão presentes na natureza englobando radicais glicosídeos e quando não estão associadas com glicosídeos (desglicosiladas ou na forma aglicona) são chamadas de antocianidinas. As antocianidinas detêm a capacidade de obter radicais livres (COOKE et al., 2005; COSTA, 2017). Há seis tipos principais de antocianidinas, a saber: cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina, pelargonidina e petunidina com uma proporção respectivamente de 50%, 12%, 12%, 7% e 7% (ZHANG; VAREED; NAIR, 2005).

Em relação as propriedades químicas as antocianidinas, são associadas com açúcares normalmente sendo a glicose, galactose, ramnose, xilose ou arabinose, tendo também outros monossacarídeos e suas possíveis combinações. Os monossacarídeos são associados com a estrutura da antocianidina a partir do grupo Hidroxila (OH) na posição C3 do anel C (HARBORNE; GRAYER, 1988; MAZZA; FRANCIS, 1995).

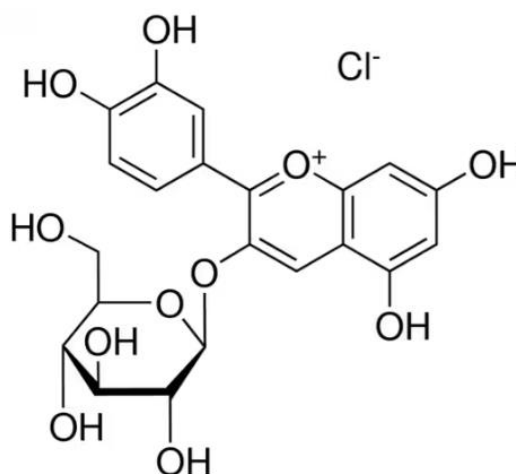
As antocianinas tem grande atuação no organismo, principalmente no auxílio ao sistema imunológico, foram identificadas várias características positivas, como a ação anti-inflamatória (NIKBAKHT et al., 2021), antioxidante (DZHANFEZOVA et al., 2020), atividade antimicrobiana (MA et al., 2019), e outros benefícios para o organismo, como estudos

envolvendo obesidade (VUGIC et al., 2020), diabetes (LEE et al., 2022) e neoplasias (HE; GIUSTI, 2010; MAZEWSKI; KIM; GONZALEZ DE MEJIA, 2019).

A capacidade antioxidante, ou seja, a capacidade de eliminar radicais livres desses compostos é devido a presença do grupo Hidroxila (OH) na posição C3 do anel C e as posições 3',4' e 5' do anel B. A capacidade antioxidante é menor nas antocianinas (glicosídeos) do que nas antocianidinas (agliconas), porque diminui quanto mais monossacarídeos tem a estrutura (WANG; STONER, 2008).

A Cianidina-3-glicosídeo (CY3G) por ter a maior distribuição na natureza também é a mais estudada. Essa antocianina possui alguns sinônimos como cloreto de cianidina 3-glicosídeo ou cloreto de cianidina 3-O-glicosídeo, com uma fórmula molecular de $C_{12}H_{21}ClO_{11}$ e com peso molecular de 484,84g/mol e estrutura química conforme Figura 6

Figura 6 - Estrutura química da CY3G.



Demonstrada a estrutura química da Cianidina 3-glicosídeo (CY3G). Fonte:(“Cyanidin 3-glucoside chloride phyproof Reference Substance 7084-24-4”, [s.d.]).

Na artrite reumatóide ocorre um distúrbio no balanço entre os linfócitos Th17/Treg e da relação do linfócito T CD4+ folicular nas manifestações dessa doença. A cianidina diminui a severidade da artrite reumatóide, induzindo a produção da citocina IL-10, inibindo o aumento da diferenciação celular do linfócito Th17 e promove os linfócitos Treg em modelos *in vivo* e *in vitro* (SAMARPITA; RASOOL, 2021).

Em relação a danos em cartilagem as CTMs possuem uma grande capacidade para auto-renovação contudo, a cartilagem regenerada não consegue manter a homeostase e os condrócitos apresentam fenótipos hipertróficos. Foi avaliado que a cianidina nesse modelo inibiu os marcadores condrogênicos *Sry-related hmg-box gene 9 (SOX9)*, *Collagen type II alpha 1 (COL2A1)* e os marcadores hipertróficos *Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* e *Collagen type X alpha-1 (COL10A1)*. Resultando assim na atuação da cianidina na inibição da diferenciação condrogênica e hipertrófica resultante de CTMs (CAO et al., 2018).

Em modelo de Colite (uma inflamação do cólon) *in vivo* de camundongos e *in vitro* de Células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), estimulados com LPS verificou-se que a cianidina 3- glicosídeo e a aglicona cianidina inibiram a atuação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, e verificou-se a inibição de NO. Mostrado que a cianidina nas duas formas apresentadas tem a capacidade anti-inflamatória para atuar nessa doença inflamatória intestinal (GAN et al., 2020).

Pela literatura sabemos que a cianidina tem grande potencial anti-inflamatório enquanto que a CTM tem um perfil imunorregulatório, podendo atuar tanto como anti-inflamatória como também com um perfil imunossupressor. No entanto, na literatura não existem estudos sobre os efeitos imunorregulatórios da cianidina sobre as células-tronco mesenquimais, justificando assim a necessidade de pesquisar sobre esse assunto.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que as CTMs influenciam a modulação do sistema imune e a cianidina apresenta ação anti-inflamatória, este trabalho teve como o objetivo investigar os efeitos da cianidina sobre alguns aspectos imunoregulatórios CTMs.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para tal, foram avaliadas:

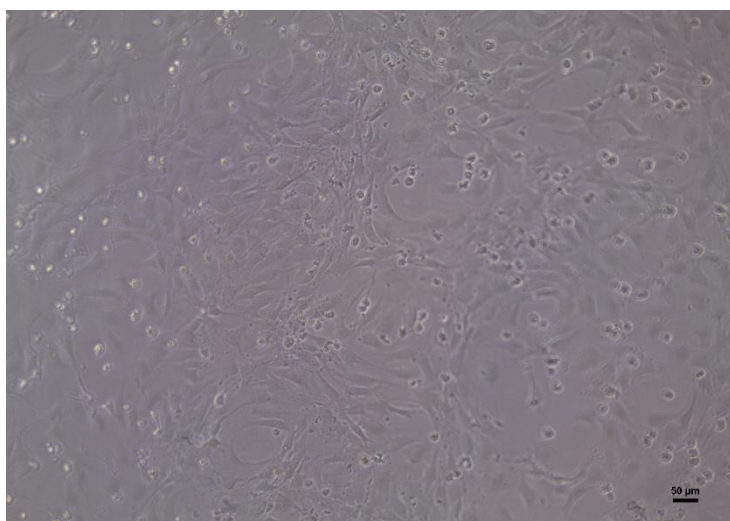
- A padronização da dose de cianidina por ensaio de MTT, avaliação da viabilidade, apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo sobre as células C3H/10T1/2;
- A expressão dos fatores de transcrição NF κ B, STAT3 e PCNA em células C3H/10T1/2 estimuladas e cultivadas na presença de cianidina;
- A produção de fatores solúveis (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β) por ensaio de ELISA e a produção de NO por ensaio de das células C3H/10T1/2 estimuladas e cultivadas na presença de cianidina;
- As propriedades imunoregulatórias das células C3H/10T1/2, quando cultivadas na presença de cianidina, sobre as células RAW 264.7, por meio da cultura condicionada mensurando a produção de fatores solúveis (IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12) e avaliando a expressão do fator de transcrição NF κ B na linhagem RAW 264.7;
- As propriedades imunoregulatórias das células C3H/10T1/2, quando cultivadas na presença de cianidina, sobre os linfócitos esplênicos, por meio da cultura condicionada mensuramos a produção de fatores solúveis (IL-2, IL-10 e IFN- γ) e avaliamos a expressão do fator de transcrição NF κ B sobre os linfócitos esplênicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA DA LINHAGEM C3H/10T1/2

A linhagem celular utilizada *in vitro* foi a C3H/10T1/2 clone 8 (American Type Culture Collection – CCL226; EUA) que é derivada de células embrionárias de camundongos C3H. Estas células possuem características de célula-tronco mesenquimal, tendo assim uma morfologia fibroblástóide, aderência ao plástico e capacidade de se diferenciar nas linhagens (adipócitos, condrócitos e osteoblastos) conforme a Figura 7. Além disto, esta linhagem é sensível ao contato, podendo ser alterada por agentes químicos.

Figura 7 - Fotomicrografia de células da linhagem C3H/10T1/2.



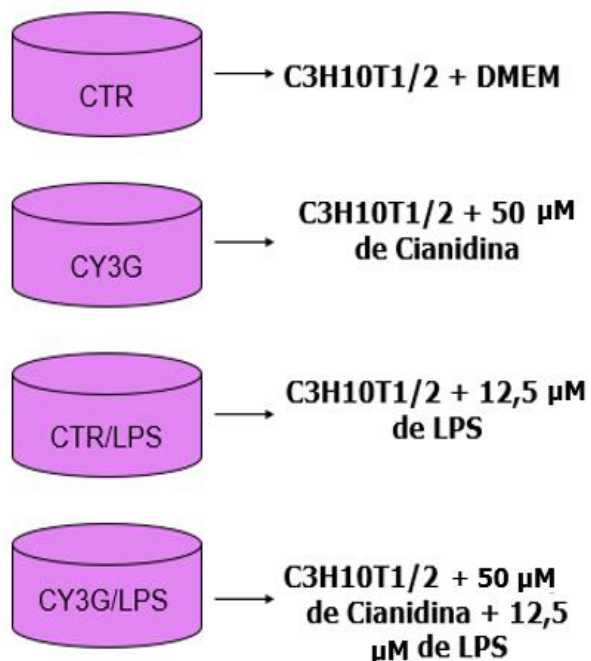
Fotomicrografia de células da linhagem C3H/10T1/2. Aumento de 200x. Fonte: Autoria própria, 2022.

As células foram cultivadas em Meio Dulbecco modificado (DMEM) de cultura estéril de baixa glicose (Vitrocell Embriolife[®], Brasil) suplementado com 10% de Soro bovino fetal (SBF) (Vitrocell Embriolife[®], Brasil), tampão HEPES (2g/L), 1% de penicilina G sódica (Sigma-

Aldrich[®], EUA) e de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®], EUA) com o pH final entre 7,2 a 7,4. Em seguida, as células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, até atingir confluência de pelo menos 70%. Após expandir-se o suficiente, passado a fase log de crescimento celular, estas foram semeadas. Todos os procedimentos envolvendo cultura celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional com o intuito de evitar contaminação das culturas celulares.

Para avaliação dos efeitos da cianidina 3-glicosilada (Sigma- Aldrich[®], EUA; PHL89616 Lot#75283695), esta considerada por sua grande estabilidade e apresentando uma pureza de $\geq 98.0\%$ (GUIMARÃES et al., 2018; ZHANG et al., 2021a, 2008). Para a escolha das doses utilizadas nas CTMs, essas células foram tratadas com diferentes doses de cianidina (3 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM), pelo tempo de 24 horas, onde após a avaliação por meio do ensaio de Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), a dose de 50 μM foi selecionada, além do controle, utilizando ou não o estímulo de 1,25 g/mL de LPS (FOCK, 2005). Sendo posteriormente realizados os plaqueamentos conforme a Figura 8.

Figura 8 - Esquematização dos grupos analisados com a linhagem CTM.



Esquematização dos grupos analisados com a linhagem C3H/10T1/2. Foram semeadas 1×10^6 células / por poço em placa de 12 poços. Grupo CTR - proveniente da linha C3H/10T1/2 sem nenhum estímulo; Grupo CY3G - proveniente da linha C3H/10T1/2 com o estímulo de $50\mu\text{M}$ de cianidina; Grupo CTR/LPS - com o estímulo de $50\mu\text{M}$ de cianidina e de $1,25\ \mu\text{g/ml}$ de Lipopolissacarídeo (LPS), Grupo CY3G/LPS - com o estímulo de $50\mu\text{M}$ de cianidina e de $1,25\ \mu\text{g/ml}$ de Lipopolissacarídeo (LPS). A figura foi feita utilizando BioRender®. Fonte: Autoria própria, 2023.

4.1.1 Padronização da dose por ensaio de MTT

Para avaliar os efeitos da cianidina 3-glicosilada (Sigma- Aldrich®, EUA; PHL89616 Lot#75283695) nas CTMs, diferentes doses da substância ($3\ \mu\text{M}$, $6,25\ \mu\text{M}$, $12,5\ \mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$ e $100\ \mu\text{M}$) foram utilizadas em células cultivadas por 24 horas. Após a avaliação pelo

ensaio de MTT, a dose efetiva foi definida. As células foram semeadas em placas de 12 poços com uma concentração de 1×10^6 células / poço e incubadas com diferentes doses de cianidina. Após o período de tratamento, o meio de cultura foi aspirado e a solução de MTT (5mg/ml em PBS) (Sigma- Aldrich[®], EUA) foi adicionada. Após incubação por 3h30min a 37°C, a solução resultante foi dissolvida em Dimetilsulfóxido (DMSO), e a absorbância foi medida a 540nm pelo espectrofotômetro Varioskan Flash (Thermo Scientific, UK) (MOSMANN, 1983).

4.1.2 Avaliação da viabilidade das CTM por Citometria de Fluxo

A avaliação de morte celular por apoptose e necrose foi conduzida por meio da marcação das células com Anexina V- Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e Iodeto de Propídio (PI). As células da linhagem CTMs foram cultivadas conforme descrito previamente, em uma densidade de 1×10^6 células por poço, em um volume total de 1000 μ L, e tratadas com cianidina e/ou estimuladas com LPS por 24 horas, de acordo com a Figura 8.

Figura 8 - Esquematização dos grupos analisados com a linhagem CTM.

Em seguida, as células foram tripsinizadas e submetidas a duas centrifugações de 10 minutos a 106g. Para cada amostra, 3 μ L de Anexina V, 50 μ L de tampão Anexina V-FITC e 8 μ L de PI foram adicionados, e a suspensão foi incubada por 20 minutos protegida da luz. Após incubação, 200 μ L de tampão Anexina foram adicionados e a aquisição dos dados foi realizada em um citômetro de fluxo (FACScan[®], Becton Dickson, EUA). A análise foi conduzida com base na porcentagem de células marcadas com Anexina V-FITC e/ou PI, utilizando o software FlowJo[®] (Tree Star, EUA).

4.1.3 Avaliação do ciclo celular das CTMs por Citometria de Fluxo

No primeiro passo deste experimento, foi realizada uma fase de carência com o objetivo de sincronizar os cultivos na fase G0/G1, por meio de incubação das células com meio de cultura DMEM contendo 0,5% de SBF por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas de acordo com as condições descritas anteriormente e posteriormente suplementadas por 24 horas, conforme a Figura 8.

A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 106g e o sobrenadante foi descartado. A próxima etapa consistiu em adicionar 200 μ L de Triton X-100 0,1% + Citrato de Sódio 0,1% em PBS e 20 μ L de RNase (4mg/ml) em PBS, o qual foi incubado por 25 minutos no escuro. Para a marcação do DNA, as células foram incubadas com 5 μ L de PI (BD Pharmigen, Becton Dickson, EUA) por 5 minutos no escuro. A aquisição dos dados foi realizada pelo citômetro de fluxo FACS Canto II e a progressão do ciclo celular foi avaliada pela quantificação da porcentagem das regiões correspondentes às fases G0/G1 e S/G2/M no software FlowJo[®] (Tree Star, EUA).

4.1.4 Suplementação dos cultivos com cianidina e geração dos ‘meios condicionados’

As células da linhagem C3H/10T1/2 foram semeadas e mantidas em cultura até atingirem uma confluência de 70%. O sobrenadante foi removido e a monocamada celular foi lavada com Solução tampão fosfato salina (PBS). Em seguida, foi adicionado meio de cultura DMEM (Vitrocell Embriolife[®], Brasil), contendo 10% de SBF e 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich[®], EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®], EUA). Os cultivos foram mantidos por 24 horas, com ou sem o estímulo de cianidina a uma concentração de 50µM e/ou com ou sem o estímulo de 1,25 µg/mL de LPS de *Escherichia coli* (cepa O55:B5) (Sigma-Aldrich[®], EUA; 8274 Lot#46H4024), de acordo com um protocolo previamente padronizado no laboratório (DOS SANTOS et al., 2017; FOCK et al., 2007; FOCK, 2005), conforme delineamento experimental da Figura 8. Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado e uma alíquota foi separada para dosagem de citocinas e óxido nítrico, enquanto a outra foi usada para a geração de "meios condicionados", ambos armazenados a -40°C. As células foram, em seguida, tripsinizadas ou não para os demais ensaios experimentais.

4.1.5 Avaliação de citocinas produzidas por CTMs

As CTMs foram cultivadas conforme descrito anteriormente, na concentração de 1×10^6 células / poço, num volume total de 1000 µL, cultivadas na presença e ausência de cianidina e estimuladas ou não com LPS, conforme a Figura 8. Após 24 horas, o sobrenadante dessas células coletado, identificados e armazenado a -40°C para posterior quantificação de citocinas. A determinação das concentrações de IL-1β (Catálogo DY401, R&D System, EUA), IL-6 (Catálogo DY406, R&D System, EUA), IL-10 (Catálogo DY417, R&D Systems, EUA) e TGF-β (Catálogo DY1679, R&D System, EUA), presentes no sobrenadante das culturas celulares foram realizadas pelo Ensaio imunosorbente ligado à enzima (ELISA) (Quantikine[®] ELISA, R&D Systems, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

4.1.6 Avaliação da produção de NO por ensaio de Griess

Para avaliar a produção de NO, foram empregados os sobrenadantes das CTMs, de acordo com os grupos experimentais descritos na. Em cada poço de uma placa, adicionou-se 100 µL do sobrenadante e 50 µL da solução de sulfanilamida (S9251-100G, Sigma-Aldrich®, EUA) em ácido fosfórico a 5% em água ultrapura. Após 10 minutos de incubação a 37°C, adicionou-se 50 µL da solução contendo 0,1% de N-naftiletilenodiamina (NED) (Merck & Co., Inc., USA) em água ultrapura e incubou-se a temperatura ambiente por mais 10 minutos (TSIKAS, 2007).

As leituras da absorbância foram feitas a 540nm, pelo espectrofotômetro Varioskan Flash (Thermo Scientific, UK).

4.1.7 Determinação da Expressão de NFκB, STAT3 e PCNA

4.1.7.1 SDS-PAGE e Western blotting

4.1.7.2 Preparo de gel de poliacrilamida

De acordo com o protocolo de SAMBROOK; RUSSELL, (2001), descrito brevemente abaixo, foram preparados géis em bicamada. A camada superior (gel de empacotamento) consistiu de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% Sódio dodecil sulfato (SDS), 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED, enquanto o gel inferior (resolutivo) foi preparado com 10% de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl, pH 8,8, 0,1% persulfato de amônio e 0,077% TEMED.

4.1.7.3 Preparo de lisado de proteína

Os lisados foram obtidos a partir de uma cultura de 1×10^6 células, utilizando tampão RIPA[®] (0,1% SDS, 1% Igepal CA-630, 1% deoxicolato de sódio, 10mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 100µg/ml PMSF, 0,5 mM EDTA). Após serem submetidos a um ciclo de vortexação de 30 segundos e centrifugação por 15 minutos a 20.817g a 4°C, o sobrenadante foi quantificado e 200µg de proteínas foram misturados ao tampão Laemmli (3x concentrado, 100 mM Tris.HCL, pH 6,8, 5% 2-mercaptoetanol (v/v), 2% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol). A amostra foi desnaturada em um Dry block a 100°C por 10 minutos e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.1.7.4 Transferência de proteína do gel para a membrana (Nitrocelulose)

O gel que continha as proteínas separadas por eletroforese foi submetido a uma incubação de 10 minutos em um tampão de transferência que consistia de 3 mM de glicina, 48 mM de Tris base, 0,037% de SDS, 20% de metanol, pH 8,3. Simultaneamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e também incubada em tampão de transferência. Em seguida, foi montado um "sanduíche" com a seguinte sequência: esponja, duas folhas de papel 3mm, membrana, gel, duas folhas de 3mm (Whatman), e esponja. Posteriormente, foi realizada a transferência em uma cuba de eletroforese na presença do tampão de transferência sob uma corrente constante de 100 mA por 120 minutos.

4.1.7.5 Sondagem das proteínas com anticorpos

Nesta etapa experimental, os sítios livres de proteínas das membranas foram bloqueados com proteínas de leite desnatado Molico a 5% em PBS TBST durante 2 horas sob agitação. Os

anticorpos primários, conforme descrito na Tabela 1, foram diluídos em tampão TBS contendo Tween e incubados na membrana por um período de 12 horas sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi submetida a três lavagens com TBS-Tween durante 10 minutos sob agitação. As proteínas foram identificadas por meio da sondagem com anticorpo Anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase de raiz forte (R&D Systems, EUA) diluído em TBST (TBS com Tween) 1:1000 durante 2 horas sob agitação, seguido de três lavagens com TBST por 10 minutos sob agitação.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	FORNECEDOR	CATÁLOGO	LOTE
Anti – NFκB	1: 1000	Santa Cruz	sc-372	F0414
Anti - p-NFκB	1: 1000	Santa Cruz	sc-33039	B0515
Anti - STAT3	1: 1000	Santa Cruz	sc-482	A1916
Anti - p-STAT3	1: 1000	Santa Cruz	sc-8001-R	L3015
Anti – PCNA	1: 1000	Santa Cruz	sc-56	B1306

Tabela 1: Anticorpos utilizados, concentração, fornecedor, número de catálogo e lote.

Os resultados foram normalizados pela β -actina (Sigma, St. Louis, EUA, #A3854), que foi diluída para 1: 50.000 em tampão TBS-Tween, por 2 horas.

4.1.7.6 Revelação com sistema quimioluminescente

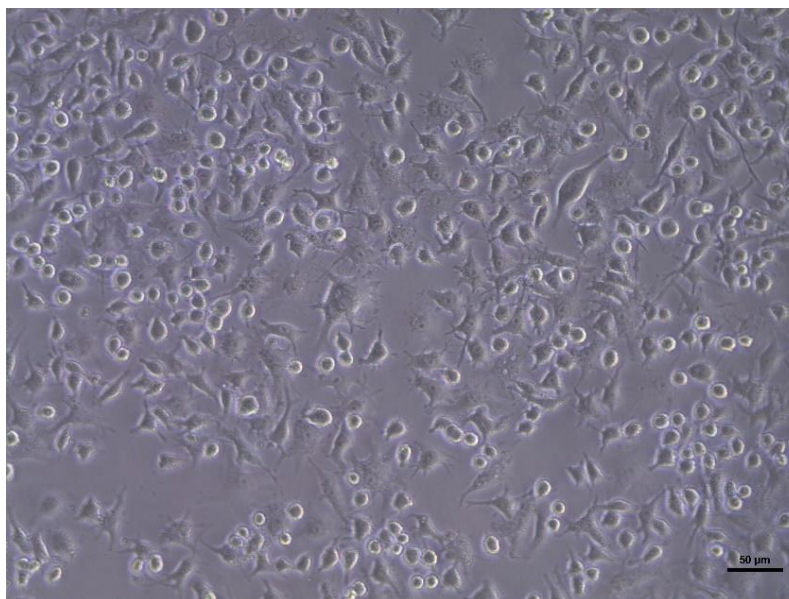
As bandas reativas foram identificadas e visualizadas através da utilização do Kit ECL TMAmersham TM Prime (Cytiva / Global Life Sciences, Reino Unido, Lote RPN2232.I), enquanto as imagens foram capturadas por meio do digitalizador de Imagem ImageQuant 400

(GE Helthcare, EUA). Para obter uma análise padronizada e quantitativa das imagens, foi utilizado o software ImageQuant TL[®] (GE Helthcare, EUA).

4.1.8 Efeito meio condicionado de CTM sobre a produção de citocinas e expressão de NFκB de células monocíticas

Nessa etapa, empregou-se células monocíticas da linhagem Raw 264.7 (*Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*), selecionada por apresentar morfologia análoga à de macrófagos/monócitos conforme a Figura 9. As células foram cultivadas em meio DMEM baixa glicose (Vitrocell Embriolife[®], Brasil) suplementado com 10% de SBF (Vitrocell Embriolife[®], Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich[®] EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®], EUA), em condições de umidade (95%), temperatura (37°C) e concentração de CO₂ (5%). O meio de cultura foi trocado a cada três dias, e as células foram raspadas com uso de um raspador de células.

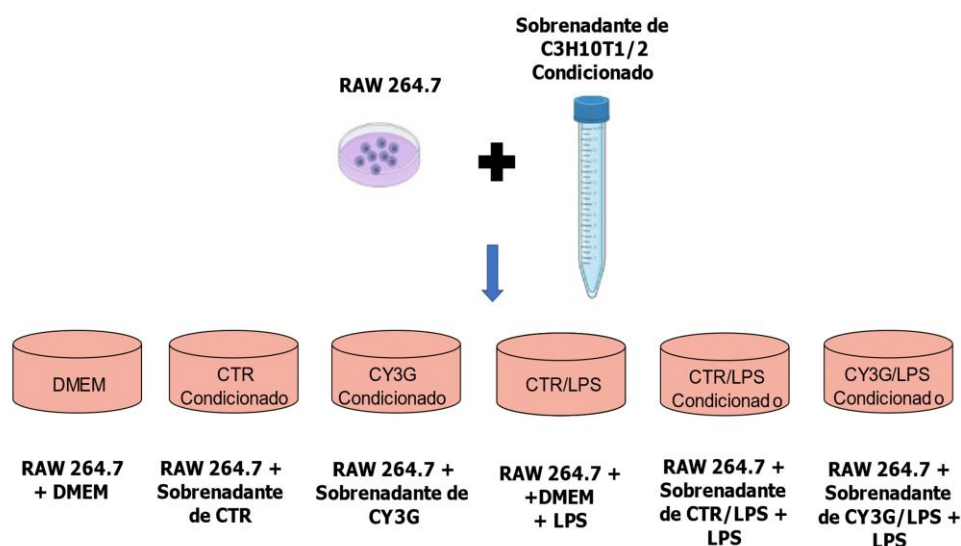
Figura 9 - Fotomicrografia de células da linhagem Raw 264.7



Fotomicrografia de células da linhagem Raw 264.7. Aumento de 200x. Fonte: Autoria própria, 2022.

Quando a confluência das células atingiu 70%, foram contadas e semeadas em placas de 12 poços, com uma densidade de 1×10^6 células por poço. As células foram expostas a "meio condicionado" com e sem estímulo de LPS por 24 horas, enquanto os cultivos foram usados como controles, estimulados ou não pelo mesmo período, conforme a Figura 10. Após esse tempo, o sobrenadante das células foi coletado em tubos identificados e armazenados a -40°C para posterior dosagem de citocinas, enquanto a monocamada de células foi solta com o uso de raspador de células para avaliação da expressão proteica por meio do ensaio de *Western blotting*. A dosagem das citocinas IL-1 β (Catálogo DY401, R&D System, EUA), IL-6 (Catálogo DY401, R&D System, EUA), IL-10 (Catálogo DY417, R&D System, EUA) e IL-12 (Catálogo DY419, R&D System, EUA) presentes no sobrenadante das culturas foi realizada por meio do método de ELISA, seguindo as orientações do fabricante. O *Western blotting* para NF κ B foi realizado conforme descrito anteriormente.

Figura 10 - Esquematização dos grupos analisados com a linhagem Raw 264.7



Esquematização dos grupos analisados com a linhagem Raw 264.7. A figura foi feita utilizando BioRender®. Fonte: Autoria própria, 2023.

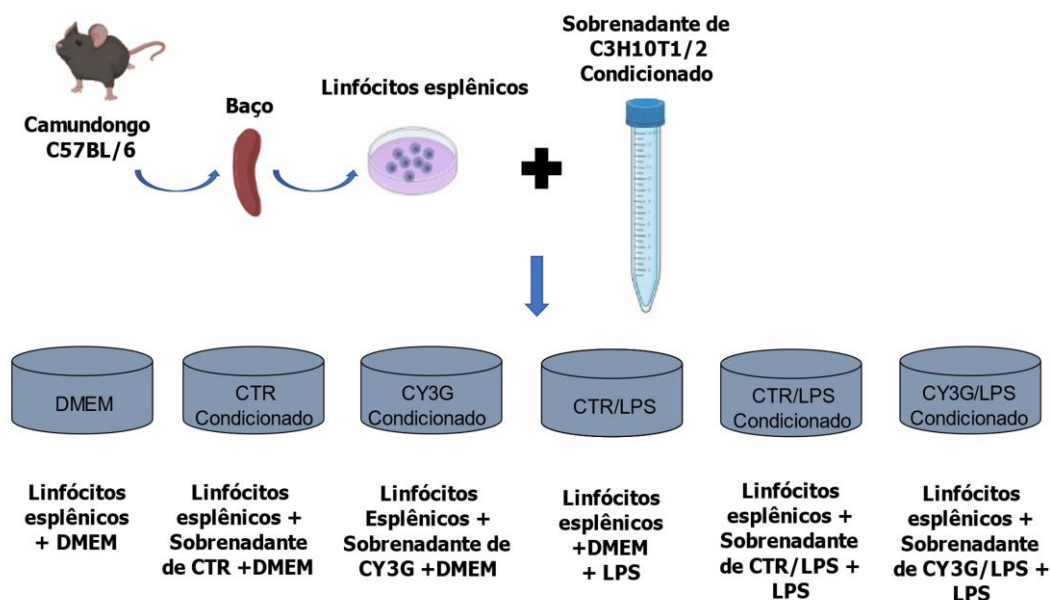
4.1.9 Efeito meio condicionado de CTM sobre a produção de citocinas e expressão de NFκB de células linfocíticas

Nesta fase do estudo, foram empregados baços de camundongos machos pertencentes à linhagem C57BL/6, com 9 semanas de idade, isogênicos. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), sob o protocolo CEUA nº 627. Após a eutanásia dos animais, o baço foi removido sob condições assépticas e transferido para uma placa de Petri contendo meio de cultura DMEM (Vitrocell Embriolife[®], Brasil). Na placa de Petri, a cápsula do órgão foi rompida em uma de suas extremidades com a ajuda de duas agulhas dobradas em formato de “L” e fixadas em seringas, e seu conteúdo intracapsular foi suspenso no meio de cultura DMEM, enquanto sua cápsula foi descartada.

O conteúdo intracapsular foi recolhido e adicionado a 9 mL de meio DMEM, decantado por 20 segundos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de plástico de 15 mL, com forte agitação para completa dissociação celular. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 160g a 25°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura DMEM para a contagem em câmara de Neubauer, após diluição 1:100 com líquido de Turk. As células foram plaqueadas em placas de 12 poços com um total de 1×10^6 células por poço.

O meio condicionado, com e sem estímulo de LPS, foi adicionado às culturas, que foram usadas como controle e estimuladas ou não pelo mesmo período com LPS, conforme a Figura 11. Após 24 horas, o sobrenadante dessas células foi separado em *eppendorfs*, identificados e congelados a -40°C para posterior dosagem de citocinas. As células foram separadas e processadas para avaliação da expressão proteica pelo ensaio de *Western blotting*. A dosagem de IL-2 (Catálogo DY402, R&D System, EUA), IL-10 (Catálogo DY417, R&D System, EUA) e IFN-γ (Catálogo DY485, R&D System, EUA) presentes no sobrenadante das culturas foi realizada pelo método de ELISA, seguindo as orientações do fabricante. O *Western blotting* para NFκB foi conduzido conforme descrito anteriormente.

Figura 11 – Esquematização dos grupos analisados com os linfócitos esplênicos.



Esquematização dos grupos analisados com os linfócitos esplênicos. A figura foi feita utilizando BioRender®. Fonte: Autoria própria, 2023.

4.1.10 Análise Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade e classificados como paramétricos ou não paramétricos com base na aderência à curva Normal (curva Gaussiana). Para a linhagem de CTMs, foi aplicado o teste de Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnett para a padronização das doses, enquanto que nos demais estudos foi utilizado o teste ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. Na análise dos *Western Blotting* das células Raw 264.7 e dos linfócitos esplênicos, os dados foram comparados utilizando o teste t de Student. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, com um nível de significância de 95%. Para a análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software Inc., EUA).

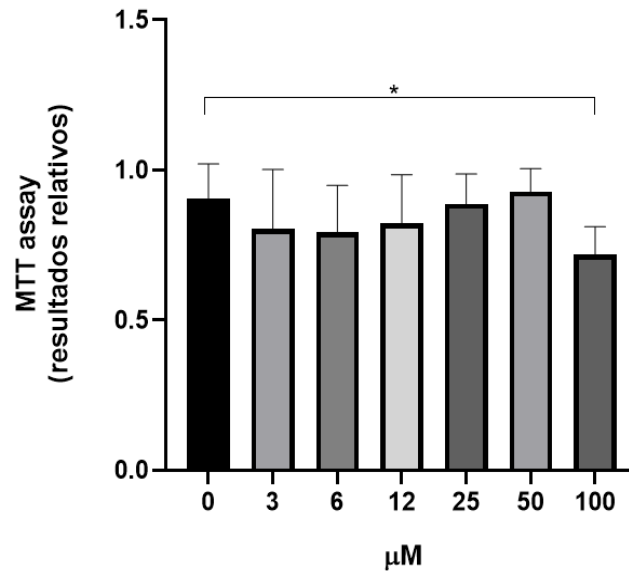
5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DAS CÉLULAS CULTIVADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CIANIDINA PELO ENSAIO DE MTT PARA DEFINIÇÃO DA DOSE

Visando escolher a dose de tratamento da cianidina, avaliamos a citotoxicidade relativa das células submetidas a cultivo com diferentes concentrações de cianidina por 24 h sem estímulo de LPS, pelo ensaio de MTT. As dosagens analisadas foram 3 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM (FENG et al., 2007; FERRARI et al., 2016; LEÓN-GONZÁLEZ et al., 2018; PARK et al., 2015) contudo, a dose escolhida de cianidina foi a de 50 μM .

Observamos aumento da citotoxicidade nas células com o tratamento de 100 μM de cianidina em comparação com seu respectivo controle, ou seja, um aumento de células em apoptose. Já o tratamento com 50 μM de cianidina conseguiu mostrar uma sobrevivência celular melhor em comparação com seu controle e essa dosagem foi selecionada para dar continuidade ao trabalho, conforme a Figura 12.

Figura 12 - Viabilidade das células CTMs pelo ensaio de MTT

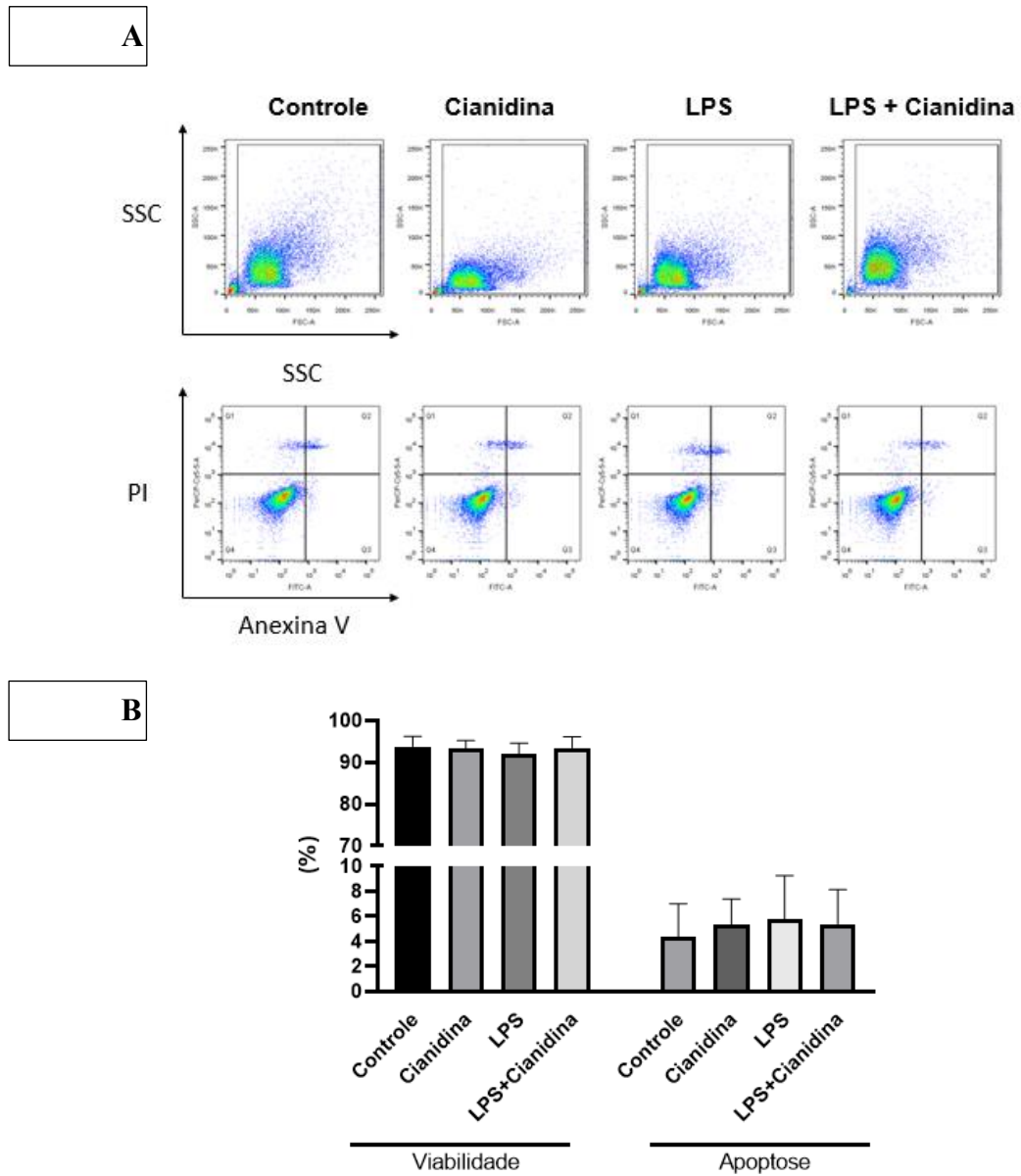


Análise da viabilidade das células CTMs pelo ensaio de MTT com diferentes concentrações de cianidina. Estas células foram cultivadas com diferentes concentrações de cianidina. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão, resultado representativo de 6 ensaios independentes (* $p < 0,05$).

5.1.1 Análise de viabilidade e apoptose das CTMs cultivadas com o estímulo de cianidina

Após o tratamento por 24 h com os grupos conforme a Figura 8, a viabilidade e apoptose foram analisadas por citometria de fluxo. A Figura 13A mostra a estratégia de análise das CTMs em todos os grupos analisados. Observamos que em todos os grupos, os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nesses parâmetros entre os grupos analisados conforme a Figura 13B.

Figura 13 - Viabilidade e apoptose das células CTMs por Citometria de Fluxo



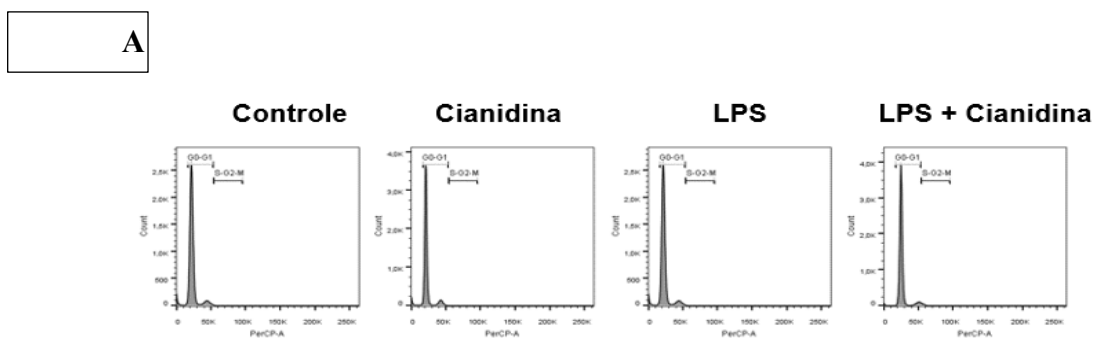
Análise da viabilidade e apoptose das células C3H/10T1/2 em Dot plot (Figura 13A). Foi realizado o gate *Forward Scatter* (FSC) x *Side Scatter* (SSC), foi posteriormente realizada a marcação de PI e Anexina V. Q1: Apoptose; Q2: Apoptose tardia; Q3: Necrose; Q4: Viáveis. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. Análise da viabilidade e apoptose das células C3H/10T1/2 em forma de gráfico de

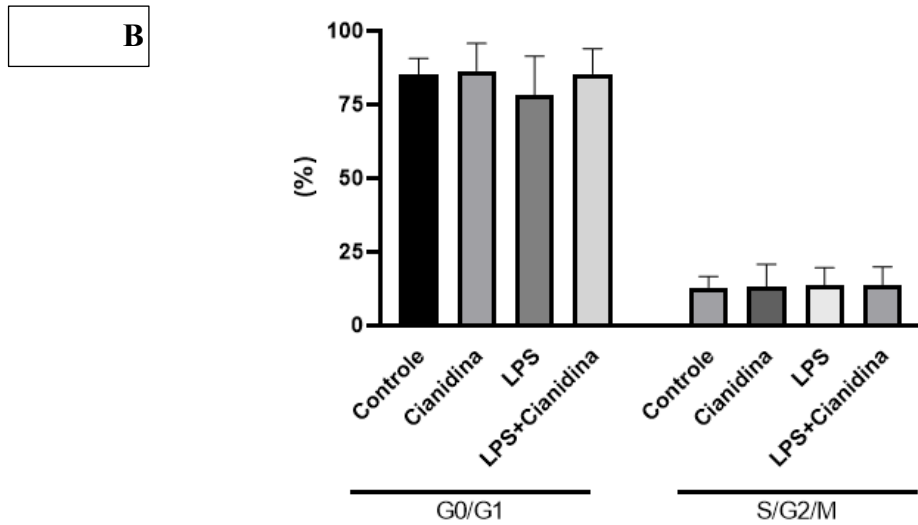
barras (Figura 13B). Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão, resultado representativo de 6 ensaios independentes (* $p < 0,05$).

5.1.2 Avaliação do ciclo celular das CTMs cultivas com o estímulo de cianidina.

Após o tratamento por 24 h com os grupos conforme a Figura 8 com a finalidade de analisar os efeitos da suplementação da cianidina na progressão do ciclo celular das CTMs, as porcentagens de células nas fases do ciclo celular G0/G1 e S/G2/M foram quantificadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que todos os grupos analisados não tiveram aumento de células na fase S/G2/M conforme a Figura 14B.

Figura 14 - Ciclo celular das células CTMs por Citometria de Fluxo





Análise do ciclo celular das células C3H/10T1/2 por histogramas (Figura 14A). Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. Análise do ciclo celular das células C3H/10T1/2 em forma de gráfico de barras (Figura 14B). Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes.

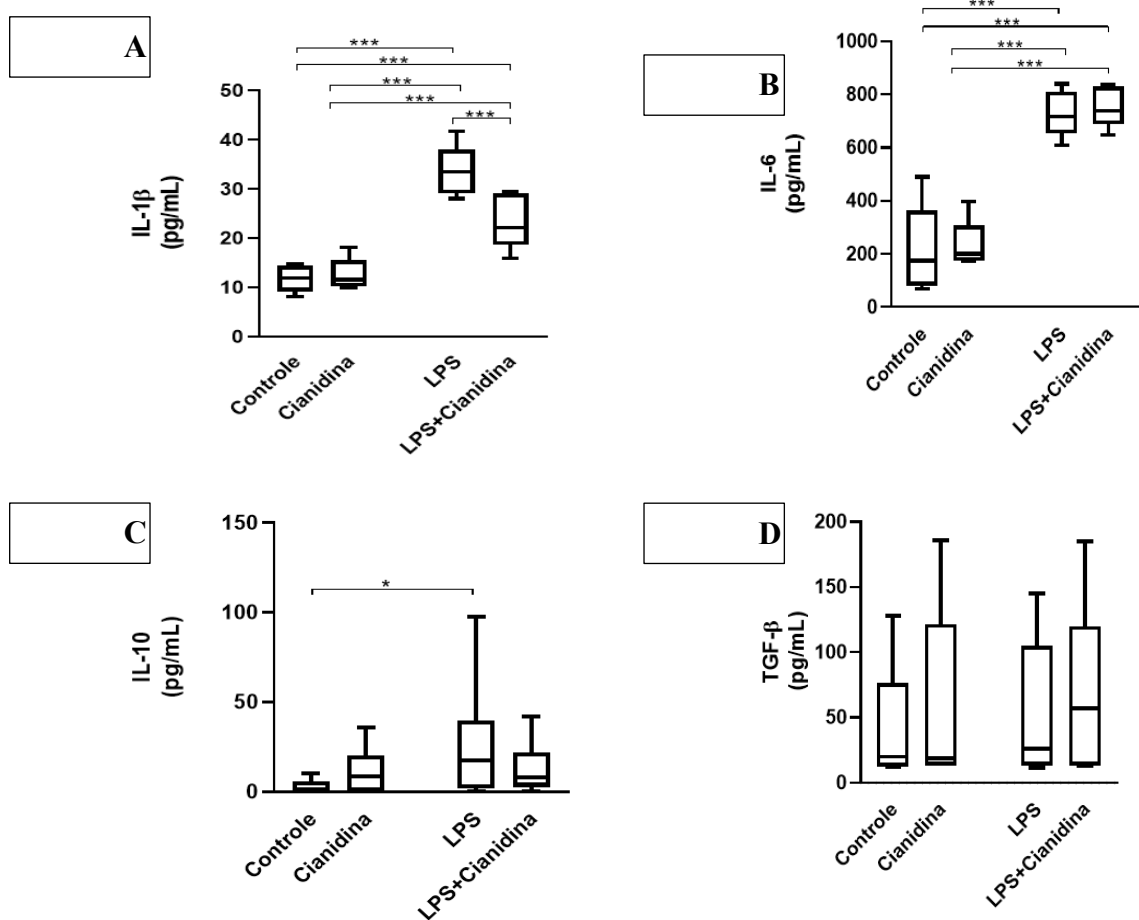
5.1.3 Análise da influência da cianidina na síntese de mediadores solúveis pelas CTMs.

Para complementar os nossos resultados e visando a influência da cianidina na ação imunorregulatória das CTMs, avaliamos a síntese de alguns mediadores solúveis sintetizados pelas CTMs após 24 horas de exposição com a cianidina conforme os grupos da Figura 8.

Analisamos a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e observamos uma diminuição na síntese no grupo de CTM com cianidina estimulada com LPS quando comparada com seu respectivo controle conforme a Figura 15A. Avaliamos também a produção da citocina IL-6, uma citocina pleiotrópica, e que nessa linhagem tem ação pró-inflamatória, observamos um aumento na síntese dessa citocina, quando as células foram estimuladas com LPS, porém não foram observadas diferenças significativas dependentes da cianidina demonstrado na Figura 15B.

Avaliamos a produção da citocina imunossupressora IL-10 e observamos um aumento de sua produção no grupo LPS, porém não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no grupo estimulado com cianidina e LPS conforme a Figura 15C. Em relação à produção da citocina TGF- β , não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados conforme demonstrado na Figura 15D.

Figura 15 – Dosagem de citocinas no sobrenadante de CTMs pelo ensaio de ELISA



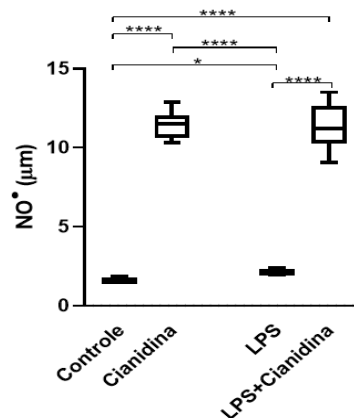
Determinação da produção de mediadores solúveis no sobrenadante das células C3H/10T1/2 pelo ensaio de ELISA. Resultados da produção de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e TGF- β (D) por CTMs. Os resultados foram expressos em gráficos boxplot, as bordas próximas ao 0 indicam o 1º percentil, a linha preta dentro da caixa indica a mediana e o limite da caixa mais distante de 0 indica o 4º percentil, estes gráficos

apresentam mediana \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0.05 e *** para p-valor < 0.001 .

5.1.4 Análise da produção de NO pelas CTMs.

Após 24 h de tratamento conforme apresentado na Figura 8, o sobrenadante foi coletado e a produção de NO foi analisada. Nos resultados obtidos observamos aumento estatisticamente significativo quando comparamos o grupo estimulado somente com cianidina e seu respectivo controle. Além disso, verificamos um aumento da produção de NO quando comparamos o grupo estimulado com cianidina e LPS, e seu respectivo controle, demonstrando ação da cianidina na modulação de NO conforme a Figura 16.

Figura 16 - Dosagem de NO no sobrenadante das CTMs pelo ensaio de Griess



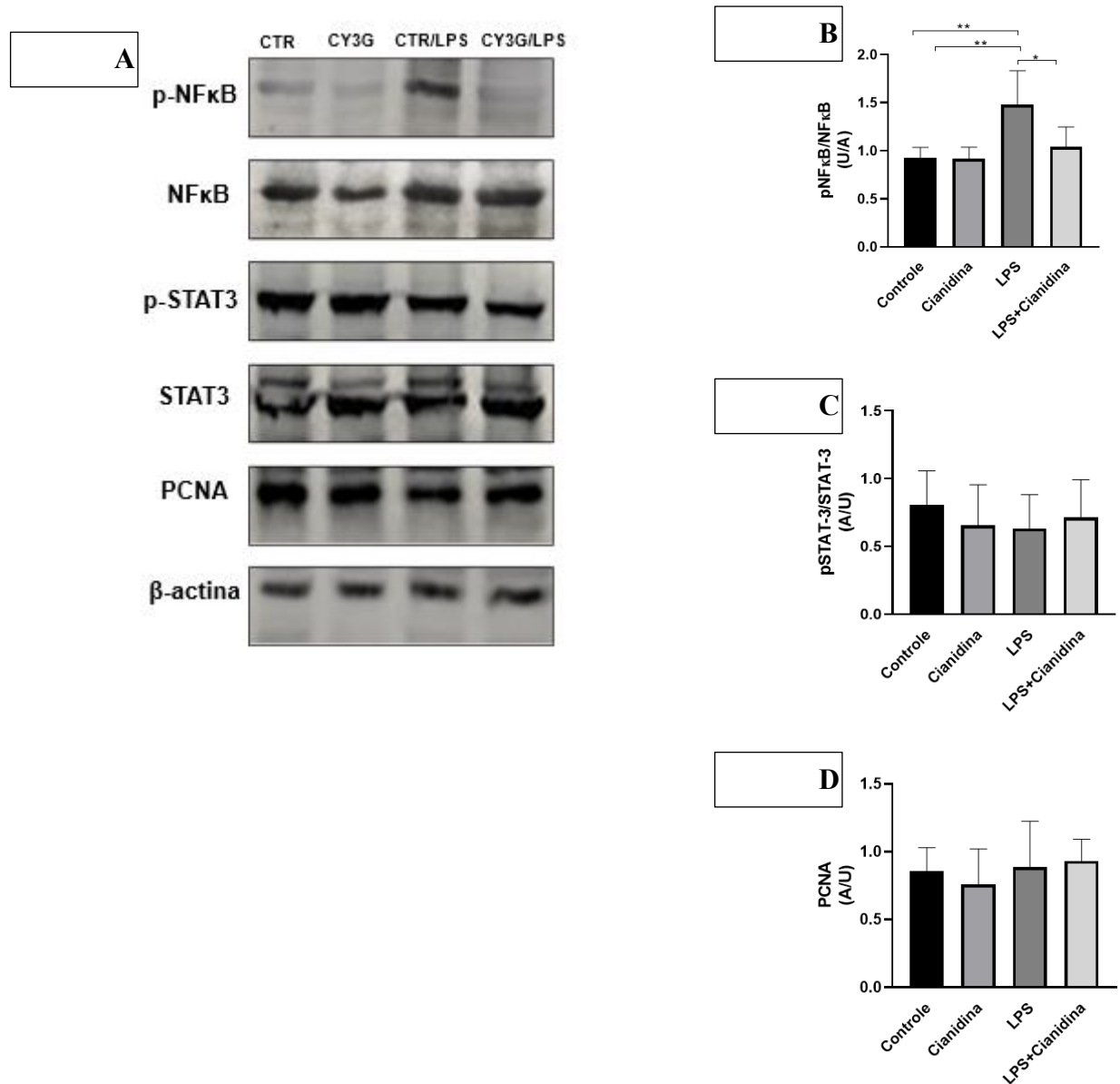
Determinação da produção de NO no sobrenadante das células C3H/10T1/2 pelo ensaio de Griess. Os resultados foram expressos em gráficos boxplot, as bordas próximas ao 0 indicam o 1º percentil, a linha preta dentro da caixa indica a mediana e o limite da caixa mais distante de 0 indica o 4º percentil, estes gráficos apresentam mediana \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. * representa diferença estatística significativa para

p-valor < 0.05 e **** para p-valor < 0.0001.

5.1.5 Análise da influência da cianidina na expressão proteica de NFκB, STAT-3 e PCNA pelas CTMs

Os fatores NFκB, STAT3 e Antígeno nuclear em proliferação celular (PCNA) são muito importantes por estarem relacionadas com diversos tipos de estímulos no organismo. O Fator de transcrição NFκB, está intimamente associado com o processo inflamatório, pois, regula os genes essenciais para este processo. Como resultados, observamos que a cianidina foi capaz de reverter o aumento da relação p-NFκB/NFκB desencadeado pelo estímulo de LPS conforme demonstrado na Figura 17B. Ainda dentro da análise de fatores de transcrição associados com as vias de processos inflamatórios, também avaliamos a relação p-STAT-3/STAT-3 conforme a Figura 17C, entretanto não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Adicionalmente, o PCNA que está relacionado com a progressão do ciclo celular, também não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, como demonstrado na Figura 17D.

Figura 17 - Expressão proteica na linhagem CTMs por *Western blotting*



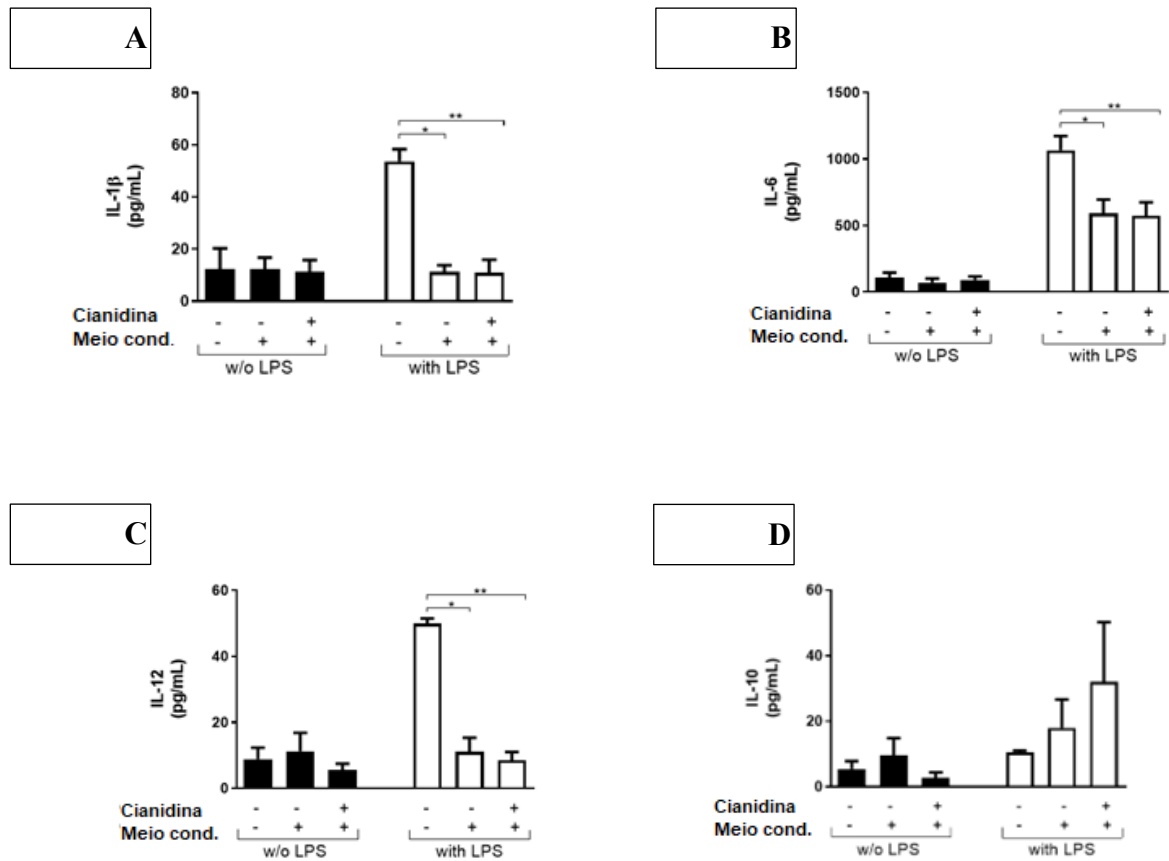
Expressão e quantificação de NFκB, STAT3 e PCNA na linhagem C3H/10T1/2. Fotos representativas das marcações nas membranas (A). Análise dos efeitos da cianidina na expressão proteica pela razão de pNFκB/NFκB (B), p-STAT-3/STAT-3 (C) e PCNA (D) das CTMs pela técnica de *Western blotting*. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0.05 e ** para p-valor < 0.01 .

5.1.6 Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 de células da linhagem RAW 264.7

Nessa etapa avaliamos a produção de citocinas de células da linhagem RAW 264.7 na presença do meio condicionado de CTMs e estimuladas ou não com LPS, conforme a Figura 10. Em relação a produção de IL-1 β não observamos diferenças entre os grupos não estimulados com LPS. Entretanto foi possível observar que o LPS aumentou a produção de IL-1 β e que o meio condicionado de CTM foi capaz de minimizar o aumento dessa citocina, sendo que o meio proveniente de CTMs cultivadas com cianidina teve um efeito superior em comparação as células somente estimuladas com LPS conforme demonstrado na Figura 18A.

No que diz respeito à produção da citocina pró-inflamatória IL-6, observamos resultados semelhantes aos observados em relação a IL-1 β , demonstrando que o meio condicionado foi capaz de minimizar o aumento dessas citocinas quando as células RAW 264.7 são desafiadas com LPS, e que o meio condicionado proveniente de CTMs que foram cultivadas na presença de cianidina esse efeito tende a ser mais proeminente, conforme pode ser observado na Figura 18B. Em relação a produção da citocina pró-inflamatória IL-12, também observamos perfil semelhante ao observado para IL-1 β e IL-6, como diminuição estatisticamente significativa de sua produção nos grupos cultivados com meio condicionado de CTM e cultivado na presença da cianidina, conforme observado na Figura 18C. Por outro lado, em relação a produção da citocina imunossupressora IL-10, verificamos tendência de aumento de sua produção nos grupos CTR/LPS Condicionado e CY3G/LPS Condicionado em comparação com seu respectivo controle, contudo essas diferenças não foram estatisticamente significativas conforme a Figura 18D.

Figura 18 - Produção de citocinas do sobrenadante de células Raw 264.7

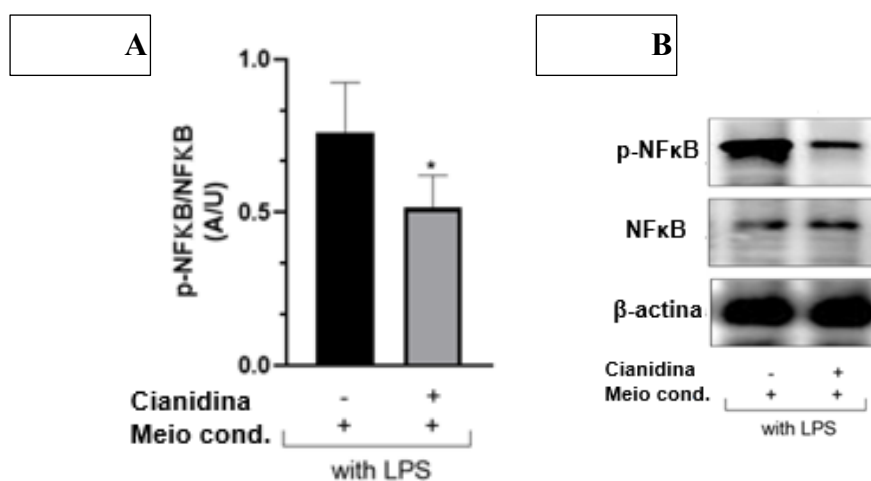


Determinação da produção de mediadores solúveis do sobrenadante de células Raw 264.7. Resultados da produção de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12 (C) e IL-10 (D) do sobrenadante das células Raw 264.7 após cultura por 24 horas com meios controle e 'condicionados', desafiados com LPS e mensurado pela técnica de ELISA. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0.05 e ** para p-valor < 0.01 .

5.1.7 Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre o a expressão de NF κ B de células da linhagem RAW 264.7

Devido à importância do fator de transcrição NF κ B no processo inflamatório, a sua expressão proteica foi analisada na linhagem Raw 264.7 em células estimuladas com LPS e cultivadas na presença de meio condicionado de CTM cultivada sem ou com cianidina, conforme a Figura 10. Observamos que o meio condicionado de CTMs cultivadas com cianidina foi capaz de diminuir a expressão da relação p-NF κ B/NF κ B em células da linhagem Raw 264.7 quando comparado com o meio de CTMs cultivadas sem a presença de cianidina, conforme a Figura 19A.

Figura 19 - Expressão de NF κ B fosforilado e total na linhagem Raw 264.7 por *Western blotting*



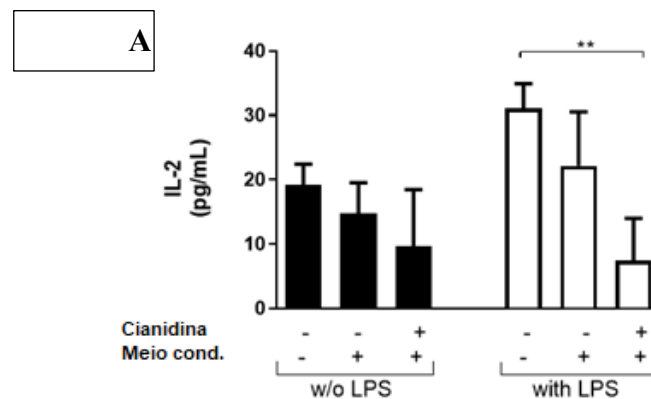
Expressão e quantificação de NF κ B fosforilado e total na linhagem Raw 264.7. Análise dos efeitos da cianidina na expressão proteica pela razão de pNF κ B/NF κ B (A) na linhagem RAW 264.7 após cultura por 24 horas com meios controle e ‘condicionados’, desafiados com LPS. Fotos representativas das marcações nas membranas (B). Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes mensurado pela técnica de *Western blotting*. * representa diferença estatística significativa

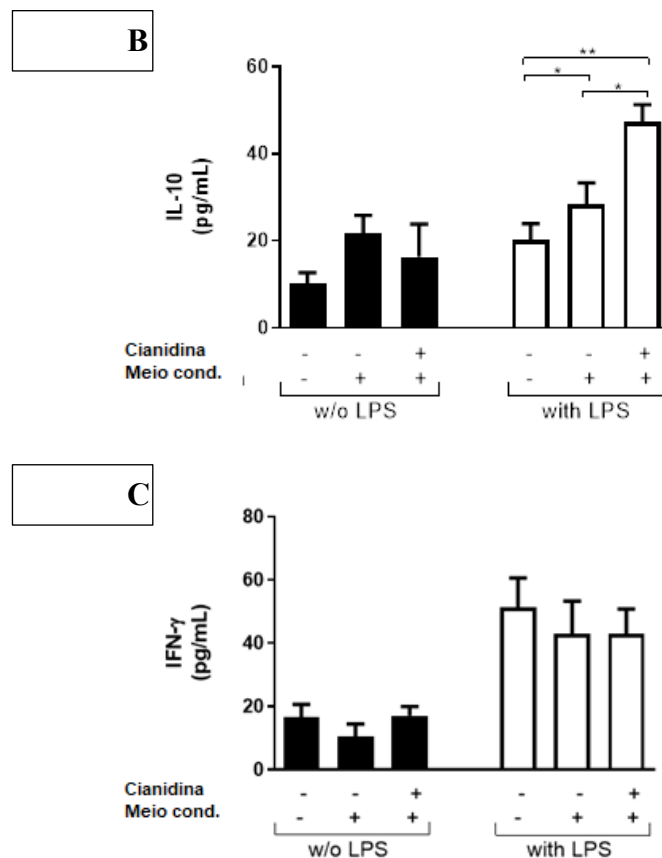
para p-valor < 0.05.

5.1.8 Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre o a produção de IL-2, IL-10 e IFN- γ de células linfóides esplênicas

Nessa etapa avaliamos a produção de citocinas de células linfóides esplênicas na presença do meio condicionado de CTMs e estimuladas ou não com LPS, conforme a Figura 11. Ao analisarmos a produção da citocina IL-2, considerada uma citocina pró-inflamatória, verificamos que o meio condicionado de CTMs cultivadas na presença de cianidina foi capaz de inibir o aumento dessa citocina como observado em comparação com as células estimuladas com LPS e cultivadas na ausência do meio condicionado de CTMs, conforme a Figura 20A. Em relação a produção de IL-10, como já comentado uma citocina com ação imunossupressora, foi observado que o meio condicionado foi capaz de aumenta a produção dessa citocina em células linfóides esplênicas estimuladas com LPS e que esse aumento foi mais evidente nas células esplênicas estimuladas com LPS e tratadas com meio condicionado de CTMs cultivadas com cianidina, como demonstrado na Figura 20B. Por outro lado, em relação a citocina IFN- γ não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados conforme observado na Figura 20C.

Figura 20 - Produção de citocinas do sobrenadante de linfócitos esplênicos





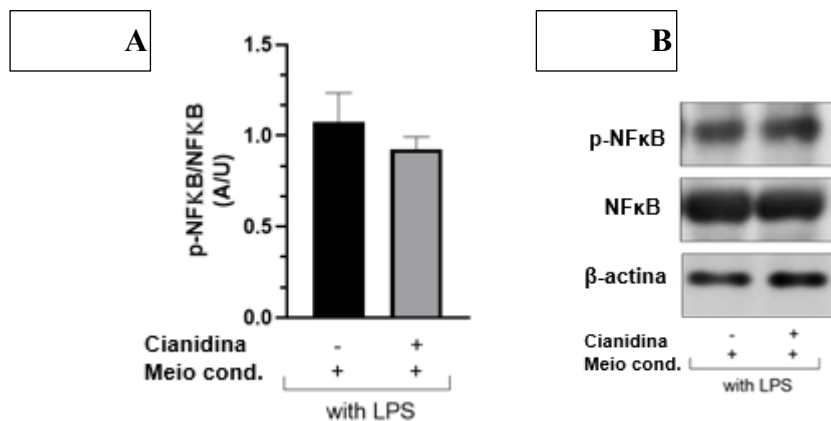
Determinação da produção de mediadores solúveis do sobrenadante de linfócitos esplênicos. Resultados da produção de IL-2 (A), IL-10 (B) e IFN- γ (C) do sobrenadante de linfócitos esplênicos após cultura por 24 horas com meios controle e ‘condicionados’, desafiados com LPS. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes mensurado pela técnica de ELISA. * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0.05 e ** para p-valor < 0.01 .

5.1.9 Efeito do meio condicionado de CTMs estimuladas com cianidina sobre o a expressão de NF κ B de células linfóides esplênicas

Ainda, de maneira de melhor entender a influência da cianidina em relação às capacidades imunorregulatórias das CTMs, avaliamos a expressão do fator de transcrição NF κ B nas células esplênicas, assim como feito com as células da linhagem Raw 264.7, demonstrado

anteriormente. Entretanto, nas células linfóides esplênicas, apesar de apresentar uma tendência na diminuição da p-NFκB/NFκB, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, conforme a Figura 21A.

Figura 21 - Expressão de NFκB fosforilado e total em linfócitos esplênicos por *Western blotting*



Expressão e quantificação de NFκB fosforilado e total em linfócitos esplênicos. Análise dos efeitos da cianidina na expressão proteica de pNFκB/NFκB (A) em linfócitos esplênicos após cultura por 24 horas com meios controle e ‘condicionados’, desafiados com LPS. Fotos representativas das marcações nas membranas (B). Os resultados foram expressos na forma de média ± desvio padrão. Resultado representativo de 6 ensaios independentes e mensurado pela técnica de *Western blotting*.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, uma grande parte das doenças crônicas está associada com algum grau de inflamação, desde a vários tipos de câncer, aterosclerose, artrite reumatóide, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças degenerativas e autoimunes entre outras (GRIFFIN et al., 2019; HIRATA et al., 2020; JIE; YU, 2019; KARUNAKARAN et al., 2021; KIMBALL et al., 2018). Esses dados são confirmados e associados com o aumento da população sênior ao redor do mundo (WU et al., 2020b). Estas doenças estão associadas com diversos fatores de risco como: má alimentação, tabagismo, sedentarismo, exposição a substâncias tóxicas e infecções (FURMAN et al., 2019).

A inflamação faz parte de um processo evolutivo, este sendo indispensável para a homeostasia do organismo, este processo é desencadeado por diversas situações como em dano tecidual com intuito de reparação do mesmo, contato com patógenos e com substâncias tóxicas/nocivas (PARIJS; ABBAS, 1998). Este processo envolve a ativação, recrutamento e ativação de diversas células do sistema imune inato e adaptativo (HEO et al., 2019).

Os estudos que envolvem a inflamação são essenciais para o avanço de novas estratégias terapêuticas com maior eficácia de tratamento de doenças com caráter inflamatório (BERNARDO et al., 2009). Uma das estrelas do momento envolvendo doenças inflamatórias são os tratamentos de imunoterapia baseados no uso de CTMs (KRAMPERA; LE BLANC, 2021; MUSIAL-WYSOCKA; KOT; MAJKA, 2019).

Os tratamentos em imunoterapia que utilizam as CTMs estão ganhando holofotes devido a algumas características dessas células como uma alta capacidade de crescimento *in vitro*, a sua capacidade de diferenciar-se em células da linhagem mesodérmica (adipócitos, condrócitos e osteócitos) e por sua ampla ação imunorregulatória (BAE et al., 2022; MUSIAL-WYSOCKA; KOT; MAJKA, 2019).

Atualmente, as CTMs estão sendo utilizadas nos Estados Unidos em aproximadamente 280 testes clínicos (em diversas fases) para o tratamento de diversas doenças como por exemplo: Doença de Crohn (KNYAZEV; KAGRAMANOVA; PARFENOV, 2022), câncer de ovário (BAE et al., 2022; COFFMAN et al., 2019), Doença de Alzheimer (CONE et al., 2021) entre outras (Mesenchymal stem cells - ClinicalTrials, 2023; MSC Trials , 2020).

No Brasil, temos mais de 20 estudos clínicos realizados com as CTMs para doenças como: Doença de Huntington (WU et al., 2020), Diabetes (LEE et al., 2021), Doença do Enxerto versus hospedeiro (TOBIN et al., 2013), COVID-19 (SENEGAGLIA et al., 2021), lesão da coluna espinhal (YU et al., 2019) entre outros (Mesenchymal stem cells - ClinicalTrials, 2023).

As CTMs modulam tanto as respostas inflamatórias como as respostas imunossupressoras, isso ocorre, pois, estas células desempenham um papel muito importante e regulador devido a sua atuação em casos de injúria e dano celular/ tecidual no organismo (JIANG et al., 2019; WANG et al., 2020; ZHANG et al., 2021c). Isso ocorre também pelo fato de que essas células interagem com diversas células efetoras do sistema imune, sendo por contato direto e/ ou indireto, por liberação de diversos mediadores como: os fatores solúveis, citocinas e quimiocinas (BULATI et al., 2020; SALDAÑA et al., 2019; VASILEV et al., 2019).

A cianidina é um dos principais tipos de Antocianinas que podemos encontrar na dieta e que apresenta um grande diferencial por ser muito benéfica ao organismo (LIM et al., 2021). Esta substância tem como papel de modulador da resposta imune, assim como um indutor para um perfil de resposta imunossupressora, resultando em controlar os níveis de citocinas inflamatórias e seus respectivos mediadores, até mesmo apresentando características antioxidantes entre muitas outras (RAHMAN et al., 2021; TORABIAN et al., 2019; YAO et al., 2022).

Como comentado, as CTMs estão envolvidas nos desenvolvimentos de diversas novas terapias, mas, fica a questão de como podemos potencializar ou aumentar a sua ação, como por exemplo, a sua ação imunorregulatória. Entretanto, não está claro como a cianidina pode modular as CTMs, diante do exposto, este trabalho teve o intuito de avaliar a atuação que a cianidina pode resultar na ação imunorregulatória das CTMs e a influência da cianidina sobre a capacidade imunorregulatória das CTMs sobre outras células imunes.

Inicialmente, realizamos o ensaio de MTT para escolher a dosagem de CY3G e em relação às dosagens de 3 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M verificou-se uma atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial considerada normal mostrando que essas dosagens mantiveram a sobrevivência celular. Em relação à dosagem de 100 μ M observamos uma menor sobrevivência celular, o que condiz com a literatura (NAM et al., 2016; SAULITE et al., 2019).

Os compostos fenólicos, mesmo proporcionando benefícios à saúde em doses fisiológicas como, por exemplo, em relação à sua atuação antioxidante, não podem ser desvinculados ao fato de essas substâncias apresentarem efeitos nocivos ao organismo em doses

muito altas. Isso ocorre devido a sua atuação como pró-oxidante, a partir da atuação de radicais livres que modificam o DNA ou por enzimas que atuam nessa estrutura (DIČKANCAITĚ et al., 1998; LI et al., 2008; NEVES et al., 2023). Essa mesma atuação como pró-oxidante favorece o uso de alguns polifenóis no tratamento de alguns tipos de câncer como adjuvantes quimioterapêuticos, pois, favorece os efeitos citotóxicos durante o processo de quimioterapia (GUNEIDY et al., 2020).

Nesse experimento observamos que as dosagens de 3 a 50 μM apresentaram uma proliferação relativamente parecida sendo estatisticamente significativo e que a dosagem de 50 μM foi a dosagem mais alta que não diminuiu a sobrevivência celular, devido a isso, selecionamos a dosagem de 50 μM para realizarmos os ensaios. Em outra pesquisa de nosso grupo, foi utilizada células C3H/10T1/2 com outra antocianina, a Delfinidina, este trabalho foi padronizado com o uso de 50 μM de Delfinidina, sendo este um dos motivos para escolhermos esta dosagem para possíveis comparações/correlações no futuro (NEVES et al., 2023).

A análise de viabilidade e apoptose das células C3H/10T1/2 cultivadas com CY3G por meio da técnica de citometria de fluxo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na dosagem de 50 μM de cianidina entretanto, a literatura relata que em doses altas o ciclo celular pode ser influenciado, assim nesse contexto, LONG et al., (2013) avaliou em modelo de câncer de próstata cultivados com 1mM de cianidina-3-glicosídeo proveniente de corante de milho-roxo, verificou-se uma redução da Ciclina D1 (ciclina esta que regula a transição entre as fases G1-S do ciclo celular) e um aumento na proporção de células na fase G0/G1 do ciclo celular, promovendo assim a desaceleração do ciclo celular.

O sistema imune é de suma importância para a homeostase do organismo com um todo. Os mediadores solúveis são a ponte para controlar e gerenciar a resposta inflamatória (este processo faz parte das características fisiológicas, necessário para o bom funcionamento do organismo). Para avaliar a influência da cianidina em modular a capacidade imunorregulatória das CTMs, verificamos a produção dos mediadores solúveis (citocinas) da linhagem C3H/10T1/2.

Por meio da quantificação de citocinas pelo ensaio de ELISA verificamos a produção de mediadores solúveis com características pró-inflamatórias e imunossupressoras produzidos por CTMs. Durante o processo inflamatório temos algumas citocinas que apresentam um papel crucial nesse processo, IL-1 β , TNF- α e IL-6 (FICHINA et al., 2020). Dentre as citocinas que

foram analisadas nas CTMs temos IL-1 β , IL-6 (citocinas pró-inflamatórias), IL-10 e TGF- β (citocinas imunossupressoras).

Devido ao potencial anti-inflamatório da CY3G, investigamos a influência dessa antocianina na concentração de citocinas pro- e anti-inflamatórias e observamos diminuição da concentração de IL-1 β , quando as células foram estimuladas com LPS. Resultados semelhantes foram encontrados por JIN et al., (2018), em um modelo de patogênese de degeneração macular relacionada à idade, nesse estudo utilizaram Células epiteliais pigmentares da retina humana (ARPE-19), induzindo um perfil inflamatório por *4-hidroxihexanal* (HHE) pela ativação do inflamassoma *NRL Family Pyrin Domain Containing 3* (NLRP3). Observando assim uma diminuição da produção das citocinas IL-1 β e IL-18, além de diminuição da expressão gênica de caspase-1, IL-1 β , IL-18 e NLRP3, demonstrando assim que a CY3G tem ação protetora relacionada com doenças oculares inflamatórias.

Um estudo que avaliou os efeitos das antocianinas na osteoartrite, uma doença degenerativa óssea no qual a cartilagem sofre degradação. Foi verificado que ocorreu uma diminuição da degradação da cartilagem e verificou-se assim que a atuação da CY3G, a peonidina-3-O-glicosídeo e os seus outros metabólitos diminuíram a ação da citocina IL-1 β em condrócitos resultando assim em menor degradação pela ação de Metaloproteinase de matriz - 2 (MMP-2), além de inibir a atuação da via NF κ B (WONGWICHAI et al., 2019).

Adicionalmente, a citocina pleiotrópica IL-6 que quando secretada pelas CTMs tem atuação pró-inflamatória, nesse projeto apresentou um aumento de sua síntese quando as células foram estimuladas com LPS, porém sem nenhuma diferença significativa em relação à CY3G. Essa citocina desempenha um papel muito importante na regulação do sistema imune, principalmente durante o processo inflamatório, promovendo a evasão de células tumorais e resistência em relação a morte celular (EBBING et al., 2019). Outros estudos mostraram que essa citocina está associada com a ativação da via de sinalização JAK2/STAT3 em relação à resistência a drogas antitumorais (EBBING et al., 2019; ZHONG et al., 2019).

Considerando o potencial anti-inflamatório da CY3G, pesquisamos a influência dessa antocianina na concentração de citocinas anti-inflamatórias e observamos que a citocina IL-10 apresentou aumento de sua concentração quando as células foram estimuladas com LPS e uma tendência em aumentar na presença de cianidina, porém estatisticamente esse achado não foi significativo. Essa citocina tem como principal atuação supressão do sistema imune e controle com relação ao processo inflamatório (LI et al., 2020b; SZIKSZ et al., 2015).

A IL-10 tem um papel importante no controle do sistema imune, este controle ocorre pela indução da ativação da via STAT3 (fosforilação) e um papel muito importante no bloqueio da sinalização da via do NF κ B, isso ocorre porque a IL-10 impede a translocação do NF κ B para o núcleo, resultando na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (DEGBOÉ et al., 2019; LI et al., 2020b; TOMMY et al., 2021). Segundo WANG et al., (2019) em um modelo de estudo de artrite reumatóide, com modelo *in vitro* e *in vivo* induzidos por colágeno bovino tipo II, avaliando assim a atuação da CY3G, verificou-se a diminuição de fibroblastos sinoviais artrite reumatóide em ratos, um aumento da concentração de anti-inflamatória IL-10 e aumento do número de linfócitos Treg.

Uma citocina, que tem um papel muito importante no controle da resposta imune, é o TGF- β com ação multifuncional caracterizada por modular sua ação tanto para um perfil pró ou anti-inflamatório, sendo essa citocina relacionada com diversos processos fisiológicos como as respostas imunes (inflamação), diferenciação, proliferação e o papel no desenvolvimento embrionário (DODAGATTA-MARRI et al., 2019; HATA; CHEN, 2016; SPENDER et al., 2019).

Essa citocina apresenta um papel muito importante na manutenção da homeostasia e na autoimunidade, induzindo ou inibindo as respostas imunes, isso ocorre devido a sua função na regulação de diversas células como os linfócitos Treg, linfócitos T CD4+, células Th1 entre muitas outras (BAI et al., 2019; WORTHINGTON et al., 2013). Nossos achados mostram que em relação à produção da citocina TGF- β , não observamos diferenças nas concentrações dessa citocina entre os grupos analisados. Em um modelo de nefropatia diabética em ratos, com uma suplementação de CY3G por 8 semanas, verificou-se uma inibição da expressão de TGF- β 1, mostrando que essa antocianina pode atuar no controle da diabetes (QI et al., 2020). Em relação ao TGF- β nesse estudo não podemos considerar que a sua produção pelas CTMs resultou num perfil anti-inflamatório.

O NO é um fator muito importante para imunorregulação das CTMs e possui efeito pleiotrópico. Este composto é sintetizado pela conversão do aminoácido de L-arginina pela enzima Óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e resultando em L-citrulina e NO. Tendo atuação em diversos processos biológicos como imunorregulação, inflamação, atividade microbiana, angiogênese, agregação plaquetária, cicatrização e erradicação tumoral (LI et al., 2019; MITCHELL et al., 2008; TANG et al., 2017; ZHANG et al., 2020a). Regulando a atividade de

diversas células do sistema imune como: macrófagos, linfócitos T e NK entre muitas outras (CATALDI et al., 2022; RACHEL et al., 2019).

Entretanto, um estudo que avalia o efeito da CY3G na prevenção de dano oxidativo, estimulado pela Angiotensina II (Ang II) em Células endoteliais vasculares humanas imortalizadas (EA.hy926), verificou que a cianidina inibiu a expressão proteica de iNOS, a produção de NO e induziu a regulação negativa da via NFκB (SIVASINPRASASN et al., 2016).

Alguns estudos apontam que a baixa expressão de iNOS em relação as MSCs mesmo em modelos inflamatórios, por exemplo, com o estímulo de LPS ou de TNF-α, pode ocorrer devido à alta variação de mecanismos de sinalização, já que em roedores temos a atuação de NO e em humanos a atuação daIDO (SUZDALTSSEVA et al., 2022).

Nossos resultados sugeriram o efeito oposto, verificamos um aumento da produção de NO no grupo CY3G/LPS. Um estudo avaliou a atuação da fruta Arônia (*Chockberry* como é mais conhecida na América do Norte) na Diabetes tipo I, verificou-se um aumento na produção de NO em macrófagos estimulados com IFN-γ e LPS. Algumas explicações para esses efeitos serem divergentes podem ser: os distintos procedimentos de extração, diferentes composições do extrato e a proporção diferente dos componentes bioativos resultando assim em diferentes bioatividades como, por exemplo, a maior produção de NO (GAJIC et al., 2020).

Um estudo *in vitro* que usa as MSC provenientes da medula óssea, verificou que o IFN-γ e o TNF-α induzem uma maior expressão de iNOS, gerando assim uma maior produção de NO, induzindo assim uma maior taxa de apoptose nas células analisadas. Esse processo pode ser uma explicação do motivo pelo qual as MSC transplantadas terapeuticamente residem por um curto período de tempo no organismo (LI et al., 2019).

A expressão proteica do NFκB, STAT-3 e PCNA são muito importantes por estarem relacionadas com diversos tipos de estímulos no organismo. Sendo assim, avaliamos a expressão proteica de NFκB e como resultado foi observada uma diminuição da relação p-NFκB/NFκB no grupo CY3G/LPS. Todavia, na análise da expressão proteica de STAT3 não houve diferença na razão de p-STAT3/STAT3, via esta responsável pelo processo imunossupressor. Da mesma forma, não obtivemos resultados significativos na expressão proteica de PCNA, esta proteína com atuação sobre a replicação do DNA no ciclo celular.

O NFκB está intimamente associado com o processo inflamatório, pois, regula os genes essenciais para este processo. Dessa forma, avaliamos o conteúdo proteico da razão da proteína fosforilada (forma ativa) / total desse fator de transcrição e STAT-3. O PCNA é uma proteína

associada com vários processos biológicos, incluindo o ciclo celular, as vias envolvidas com o reparo de DNA, a estabilidade do telômero, na sobrevivência celular e no metabolismo (DE MARCH et al., 2018; LEI et al., 2021; STODOLA; BURGERS, 2016).

De forma geral, verificamos em relação à produção de citocinas uma menor produção das citocinas pró-inflamatórias nas células tratadas com CY3G. Somando a este resultado temos a diminuição da razão da fosforilação do NFκB. Estes resultados demonstram que a CY3G apresenta um efeito anti-inflamatório nas células C3H/10T1/2.

O sistema imune é de suma importância para a homeostase do organismo com um todo. Os mediadores solúveis são a ponte para controlar e gerenciar a resposta inflamatória (este processo faz parte das características fisiológicas, necessário para o bom funcionamento do organismo). Para avaliar a influência da cianidina em modular a capacidade imunorregulatória das CTMs, verificando a produção dos mediadores solúveis (citocinas), a partir da produção de diversas citocinas em macrófagos da linhagem Raw 264.7 e linfócitos esplênicos após estas células serem cultivada com o meio condicionado da linhagem C3H/10T1/2. Essa etapa ocorreu para confirmar para qual perfil imunológico o secretoma das CTMs em contato com a cianidina irá modular outras células do sistema imune.

O processo infeccioso pode ser induzido por uma lesão provocada por diversas causas, física e agentes estranhos ao organismo, além disso, a inflamação pode ser dividida em aguda e em crônica. Durante o processo de inflamação uma das primeiras etapas é o recrutamento de células, mais precisamente o recrutamento de fagócitos. As principais células que realizam a fagocitose são os macrófagos, estas células são intimamente relacionadas com a atuação na imunidade inata e detém a função de liberar diversos mediadores inflamatórios (citocinas, enzimas e interleucinas (FURMAN et al., 2019; MEDZHITOV, 2008; SOCHOCKA; DINIZ; LESZEK, 2017).

Dessa forma, uma célula muito importante em relação ao processo inflamatório é o macrófago, tendo a polarização do tipo de macrófago como uma característica importante para os desenvolvimentos de doenças associadas com a inflamação, considerando que esta célula apresenta uma grande heterogeneidade e plasticidade celular. O macrófago polariza-se em duas formas com propriedades funcionais diferentes: o Macrófago classicamente ativado (M1) este apresenta uma grande síntese de iNOS e citocinas pró-inflamatórias, o outro tipo é o Macrófago alternativamente ativado (M2) este apresenta uma grande síntese de citocinas anti-inflamatórias

(LIU et al., 2021b). Assim, foram avaliadas a produção de citocinas das células da linhagem RAW 264.7, quando estimuladas e cultivadas na presença de meio condicionado de CTMs.

Entre estas citocinas analisadas, observamos que o meio condicionado de CTMs foi capaz de atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias, porém sem um efeito proeminente da ação da cianidina.

Uma citocina inflamatória muito conhecida é a IL-1 β , em macrófagos essa citocina atua em induzir o processo quimiotático e o processo de angiogênese. Os macrófagos no processo de fagocitose induzem o *burst* respiratório, induzindo assim o fenótipo M1, regulando assim o inflamassoma por estimular IL-1 β e TNF- α (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; PANICKER et al., 2019). Nossos achados mostram que o meio condicionado de CTR/LPS e o de CY3G/LPS foram capazes de diminuir a produção dessa citocina. Em estudo que avalia a atividade anti-inflamatória de amoras em monócitos humanos, verificou-se uma pequena diminuição da citocina IL-1 β em comparação com outras citocinas de mesmo perfil inflamatório (TNF α e IL-6) sugerindo que é menos provável isso ocorrer devido o bloqueio do inflamassoma (XUE et al., 2022).

Adicionalmente, a citocina IL-6 exerce um papel muito importante no processo inflamatório, tendo uma papel crucial durante doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, neoplasias e tempestade de citocinas (COVID-19)(ANIL et al., 2021; LIU et al., 2020; NADEEM et al., 2020; TAKESHITA et al., 2021). Nossos achados mostram que o meio condicionado e estimulado ou não com CY3G diminuem a produção dessa citocina pró-inflamatória. Segundo os resultados obtidos no trabalho de JIN et al., (2022) o meio condicionado de CTM estimulado com IL-4 e em contato com células RAW 264.7 após estímulo de LPS, foi verificada a inibição da expressão proteica de iNOS e ciclooxigenase (COX-2) e a inibição da transcrição de RNAm de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6, e das quimiocinas Proteína quimiotática de monócito 1 (CCL2), CCL3, CCL4 e CCL5 e de receptores de quimiocina CCR2 e CCR3.

ZHANG et al., (2020b) demonstrou que a proantocianidina de semente de uva apresentou efeitos anti-inflamatórios em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, o que pode estar relacionado a redução da produção de NO e de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de inibir as vias inflamatórias como a via da Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e do NF κ B responsáveis pela diminuição da produção dos fatores solúveis citados anteriormente. Outro estudo com polifenóis de folhas de chá (compreende flavonols,

antocianinas, flavonoides e ácidos fenólicos), observaram a diminuição da concentração de IL-6 na linhagem RAW 264.7 estimuladas com LPS e verificou-se a diminuição também de outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , além de inibir a fosforilação de p65 e I κ B resultando na inibição da atuação da via do NF κ B (SU et al., 2019a).

A IL-12, uma citocina que também possui como característica ser uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por APCs e associada com a diferenciação das respostas Th1 (LI et al., 2020a; RENAUIKAR et al., 2020). Verificamos que a produção dessa citocina diminuiu nos grupos cultivados com meio condicionado de CTM. Na literatura é descrito que a produção de IL-12 pode ser inibida por IL-10, isso ocorre nos macrófagos ao nível transcricional pela atuação da via do NF κ B e do fator de transcrição c-Rel (CHU et al., 2016; RAHIM et al., 2005).

A última citocina analisada na linhagem RAW264.7 foi a IL-10. A citocina IL-10 está constantemente relacionada a um perfil anti-inflamatório, no caso de células da micróglia esse perfil induzido por essa citocina ocorre pela inibição da ativação de inflamassoma e pela promoção da via STAT3 (SUN et al., 2019). Em modelo murino de doenças degenerativas inflamatórias após estímulo com polifenóis, ocorreu um maior estímulo da produção de IL-10, além de promover a inibição de vias inflamatórias canônicas como MAPK e NF κ B (GARCIA et al., 2020).

O próximo passo foi verificar a atuação do fator de transcrição NF κ B na linhagem Raw 264.7, verificamos que o meio condicionado de CTMs cultivadas com cianidina conseguiu diminuir a expressão da relação p-NF κ B/NF κ B em células da linhagem Raw 264.7. De maneira similar, LI et al., (2014) verificou que frações de antocianinas diminuíram a expressão proteica de NF κ B por estímulo de LPS/ IFN- γ em células Raw 264.7, inibindo a fosforilação e a translocação nuclear de p65.

Em relação a produção de citocinas de linfócitos esplênicos, quando estimulados e cultivadas na presença de meio condicionado de CTMs observamos efeitos na produção IL-2 e IL-10, porém sem efeitos na produção de IFN- γ .

Os linfócitos são células que atuam na defesa do organismo, induzem a fagocitose e a apoptose de células infectadas. Estas células expressam CD3 $^{+}$ e podem ser divididos em linfócitos T auxiliares (CD4 $^{+}$) e os linfócitos T citotóxicos (CD8 $^{+}$). Essas células são as responsáveis em regular o sistema imune. Os linfócitos T CD4 $^{+}$ possuem divisões e classificam-se em linfócitos T auxiliares Th1 que secretam as citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ ,

por outro lado, os linfócitos T auxiliares Th2 secretam as citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 (GAO et al., 2019; YANG et al., 2006).

Na análise da produção de citocinas nas células linfóides do baço, verificamos que o meio condicionado de CTM não atuou estimulando efeito na produção de IFN- γ . O IFN- γ atua tanto na imunidade inata quanto na adquirida, sendo produzido por células NK e linfócitos T (subgrupo Th1), atuando em processos inflamatórios e em respostas virais, promove a função dos macrófagos e promove a quimiotaxia de leucócitos (MENEES et al., 2021; WANG et al., 2018; WOODS et al., 2023).

Entretanto, verificamos uma inibição na produção da citocina IL-2, verificamos que o meio condicionado CY3G/LPS teve um efeito muito grande na inibição dessa citocina. Esse efeito parece ser dependente do meio condicionado, e sendo potencializada pelo estímulo da cianidina. A IL-2 é uma citocina muito importante para a imunidade, atuando na proliferação, sobrevivência e diferenciação de vários subtipos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, além de ativar os linfócitos TCD8⁺ para desenvolverem células de memória (AHN et al., 2013; NAVARRO et al., 2013). Essa citocina atua na inibição de linfócitos Treg podendo promover assim o estabelecimento de doenças, ajudando assim, a promover a resposta inflamatória ou gerar tolerância a mesma (LIU et al., 2021c; MULLINS et al., 2020).

Em relação à produção da citocina IL-10 em linfócitos esplênicos foi observado que o meio condicionado por si só conseguiu aumentar a produção dessa citocina, contudo, o meio condicionado que foi estimulado com cianidina teve um estímulo muito maior da produção de IL-10. Por outro lado, não verificamos aumento na relação p-NF κ B/ NF κ B o que vai de acordo com a literatura, pois, as antocianinas podem inibem a resposta de IL-17 e conseqüentemente inibindo a via de NF κ B (KELEPOURI et al., 2018; ZHAO et al., 2020).

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, demonstramos que a cianidina potencializou a ação da CTM para um perfil imunossupressor. Além disso, observamos que a cianidina também influencia a capacidade imunorregulatória das células-tronco mesenquimais sobre outras células do sistema imune.

As CTMs, quando suplementadas com cianidina, produzem menos a citocina pró-inflamatória IL-1 β , bem como apresentam menor fosforilação do fator de transcrição NF κ B. A cianidina potencializou o efeito imunossupressor das CTMs, sendo capaz de aumentar a produção de IL-10 e atenuar o NF κ B em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, bem como diminuir a produção de IL-2 em linfócitos estimulados com LPS.

8 REFERÊNCIAS

ABBASI-KENARSARI, H. et al. Synergistic therapeutic effect of mesenchymal stem cells and tolerogenic dendritic cells in an acute colitis mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 107006, 1 nov. 2020.

ABOONABI, A.; ABOONABI, A. Anthocyanins reduce inflammation and improve glucose and lipid metabolism associated with inhibiting nuclear factor-kappaB activation and increasing PPAR- γ gene expression in metabolic syndrome subjects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 150, p. 30–39, 1 abr. 2020.

AHN, G. et al. The JNK/NF κ B pathway is required to activate murine lymphocytes induced by a sulfated polysaccharide from *Ecklonia cava*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 3, p. 2820–2829, 1 mar. 2013.

ALMEIDA-PORADA, G.; ATALA, A. J.; PORADA, C. D. Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells for Immunotherapy and for Gene and Drug Delivery. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, v. 16, p. 204–224, 13 mar. 2020.

ANIL, S. M. et al. Cannabis compounds exhibit anti-inflammatory activity in vitro in COVID-19-related inflammation in lung epithelial cells and pro-inflammatory activity in macrophages. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1462, 14 jan. 2021.

BAE, J. et al. IL-2 delivery by engineered mesenchymal stem cells re-invigorates CD8⁺ T cells to overcome immunotherapy resistance in cancer. **Nature Cell Biology**, v. 24, n. 12, p. 1754–1765, dez. 2022.

BAGHERI, E. et al. Targeted doxorubicin-loaded mesenchymal stem cells-derived exosomes as a versatile platform for fighting against colorectal cancer. **Life Sciences**, v. 261, p. 118369, 15 nov. 2020.

BAI, X. et al. Blocking TGF- β Signaling To Enhance The Efficacy Of Immune Checkpoint Inhibitor. **OncoTargets and Therapy**, v. 12, p. 9527–9538, 31 dez. 2019.

BARKETT, M.; GILMORE, T. D. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6910–6924, nov. 1999.

BARRACHINA, L. et al. Allo-antibody production after intraarticular administration of mesenchymal stem cells (MSCs) in an equine osteoarthritis model: effect of repeated administration, MSC inflammatory stimulation, and equine leukocyte antigen (ELA) compatibility. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 52, 7 fev. 2020.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Stem Cells. v. 36, n. 4, p. 568–584, 1 abr. 2004.

BISWAS, S. et al. Exosomes Produced by Mesenchymal Stem Cells Drive Differentiation of Myeloid Cells into Immunosuppressive M2-Polarized Macrophages in Breast Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 12, p. 3447–3460, 15 dez. 2019.

BOLANDI, Z. et al. Adipose derived mesenchymal stem cell exosomes loaded with miR-10a promote the differentiation of Th17 and Treg from naive CD4⁺ T cell. **Life Sciences**, v. 259, p. 118218, 15 out. 2020.

BONFIELD, T. L. et al. Donor-Defined Mesenchymal Stem Cell Antimicrobial Potency Against Nontuberculous Mycobacterium. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1202–1216, 1 ago. 2021.

BULATI, M. et al. The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

BUSCHHAUS, J. M. et al. Effects of iron modulation on mesenchymal stem cell-induced drug resistance in estrogen receptor-positive breast cancer. **Oncogene**, v. 41, n. 29, p. 3705–3718, jul. 2022.

CAO, Z. et al. Cyanidin suppresses autophagic activity regulating chondrocyte hypertrophic differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 3, p. 2332–2342, 2018.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641–650, 1991.

CAPLAN, A. I. What's in a Name? **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 8, p. 2415–2417, ago. 2010.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, 1 jun. 2017.

CATALDI, A. et al. The Inhibition of the Inducible Nitric Oxide Synthase Enhances the DPSC Mineralization under LPS-Induced Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 14560, jan. 2022.

CHEN, H.-X. et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 4, p. 1–17, 27 abr. 2020a.

CHEN, Q.-H. et al. Mesenchymal stem cells regulate the Th17/Treg cell balance partly through hepatocyte growth factor in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 91, 28 fev. 2020b.

CHEN, X. et al. Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 6, p. 1106–1117, 13 jun. 2008.

CHENG, R.-J. et al. Mesenchymal Stem Cells: Allogeneic MSC May Be Immunosuppressive but Autologous MSC Are Dysfunctional in Lupus Patients. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, 2019.

CHINNICI, C. M. et al. Mesenchymal stromal cells isolated from human fetal liver release soluble factors with a potential role in liver tissue repair. **Differentiation**, v. 105, p. 14–26, 1 jan. 2019.

CHOU, L.-Y.; HO, C.-T.; HUNG, S.-C. Paracrine Senescence of Mesenchymal Stromal Cells Involves Inflammatory Cytokines and the NF- κ B Pathway. **Cells**, v. 11, n. 20, p. 3324, jan. 2022.

CHOWDHURY, I. et al. Curcumin attenuates proangiogenic and proinflammatory factors in human eutopic endometrial stromal cells through the NF- κ B signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 6298–6312, 2019.

CHU, H. et al. Grape-seed proanthocyanidins inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator expression in RAW264.7 macrophages by suppressing MAPK and NF- κ B signal pathways. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 159–166, 1 jan. 2016.

COCHET, F.; PERI, F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2318, nov. 2017.

COFFMAN, L. G. et al. Ovarian Carcinoma-Associated Mesenchymal Stem Cells Arise from Tissue-Specific Normal Stroma. **Stem Cells**, v. 37, n. 2, p. 257–269, 1 fev. 2019.

CONE, A. S. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate Alzheimer's disease-like phenotypes in a preclinical mouse model. **Theranostics**, v. 11, n. 17, p. 8129–8142, 13 jul. 2021.

COOKE, D. et al. Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? **European Journal of Cancer**, Cancer Chemoprevention - An Update on a Novel and Exciting Field of Oncology. v. 41, n. 13, p. 1931–1940, 1 set. 2005.

COSTA, G. R. **Efeito de extratos ricos em antocianinas ou elagitaninos de amora silvestre (*Morus nigra L.*), amora preta (*Rubus spp*), e grumixama (*Eugenia brasiliensis Lam*) no crescimento e na expressão de genes e miRNAs de diferentes linhagens de células humanas de câncer de mama.** Doutorado em Nutrição Experimental—São Paulo: Universidade de São Paulo, 31 out. 2017.

CUESTA-GOMEZ, N.; GRAHAM, G. J.; CAMPBELL, J. D. M. Chemokines and their receptors: predictors of the therapeutic potential of mesenchymal stromal cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 156, 17 abr. 2021.

Cyanidin 3-glucoside chloride phyproof Reference Substance 7084-24-4.
Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/>>. Acesso em: 12 maio. 2023.

DEGBOÉ, Y. et al. Polarization of Rheumatoid Macrophages by TNF Targeting Through an IL-10/STAT3 Mechanism. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

DE MARCH, M. et al. p15PAF binding to PCNA modulates the DNA sliding surface. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 18, p. 9816–9828, 12 out. 2018.

DIČKANCAITĖ, E. et al. Prooxidant character of flavonoid cytotoxicity: Structure-activity relationships. **IUBMB Life**, v. 45, n. 5, p. 923–930, 1998.

DODAGATTA-MARRI, E. et al. α -PD-1 therapy elevates Treg/Th balance and increases tumor cell pSmad3 that are both targeted by α -TGF β antibody to promote durable rejection and immunity in squamous cell carcinomas. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 62, 4 mar. 2019.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 1 jan. 2006.

DORRONSORO, A. et al. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- α -mediated activation of NF- κ B. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 2, p. 480–488, 2014.

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

DZHANFEZOVA, T. et al. Anthocyanin profile, antioxidant activity and total phenolic content of a strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) genetic resource collection. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100620, 1 ago. 2020.

EBBING, E. A. et al. Stromal-derived interleukin 6 drives epithelial-to-mesenchymal transition and therapy resistance in esophageal adenocarcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 6, p. 2237–2242, 5 fev. 2019.

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

ENGLISH, K. et al. Cell contact, prostaglandin E2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25^{High}forkhead box P3⁺ regulatory T cells. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 149–160, 1 abr. 2009.

FENG, R. et al. Cyanidin-3-rutinoside, a Natural Polyphenol Antioxidant, Selectively Kills Leukemic Cells by Induction of Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13468–13476, maio 2007.

FERRARI, D. et al. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits NF- κ B signalling in intestinal epithelial cells exposed to TNF- α and exerts protective effects via Nrf2 pathway activation. **Toxicology Letters**, v. 264, p. 51–58, 15 dez. 2016.

FIBBE, W. E.; NOORT, W. A. Mesenchymal Stem Cells and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 996, n. 1, p. 235–244, 2003.

FICHINA, M. C. et al. Spent hops (*Humulus Lupulus* L.) extract as modulator of the inflammatory response in lipopolysaccharide stimulated raw 264.7 macrophages. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 2020.

FOCK, R. A. et al. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF- α in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine**, v. 40, n. 2, p. 105–114, nov. 2007.

FOCK, RICARDO AMBROSIO, F. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação do receptor de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NFκB.** Doutorado em Análises Clínicas—São Paulo: Universidade de São Paulo, 18 maio 2005.

FREITAG, J. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. **Regenerative Medicine**, v. 14, n. 3, p. 213–230, mar. 2019.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. STROMAL CELLS RESPONSIBLE FOR TRANSFERRING THE MICROENVIRONMENT OF THE HEMOPOIETIC TISSUES: Cloning In Vitro and Replantation In Vivo. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331, abr. 1974.

FURMAN, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, dez. 2019.

GAJIC, D. et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract modulates immune response in vivo and in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 103836, 1 mar. 2020.

GAN, Y. et al. Cyanidin-3-O-Glucoside and Cyanidin Protect Against Intestinal Barrier Damage and 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid-Induced Colitis. **Journal of Medicinal Food**, v. 23, n. 1, p. 90–99, jan. 2020.

GAO, X. et al. Critical roles of regulatory B and T cells in helminth parasite-induced protection against allergic airway inflammation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 198, n. 3, p. 390–402, 1 dez. 2019.

GARCIA, G. et al. Bioaccessible Raspberry Extracts Enriched in Ellagitannins and Ellagic Acid Derivatives Have Anti-Neuroinflammatory Properties. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 970, out. 2020.

GONDALIYA, P. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Loaded with miR-155 Inhibitor Ameliorate Diabetic Wound Healing. **Molecular Pharmaceutics**, v. 19, n. 5, p. 1294–1308, 2 maio 2022.

GRIFFIN, P. et al. Circadian clock protein Rev-erba regulates neuroinflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 11, p. 5102–5107, 12 mar. 2019.

GUIMARÃES, M. et al. Improvement of the Color Stability of Cyanidin-3-glucoside by Fatty Acid Enzymatic Acylation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 38, p. 10003–10010, 26 set. 2018.

GUNEIDY, R. A. et al. Antioxidant or pro-oxidant and glutathione transferase P1-1 inhibiting activities for Tamarindus indica seeds and their cytotoxic effect on MCF-7 cancer cell line. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 74, 19 nov. 2020.

GUO, S. et al. Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Loaded with Phosphatase and Tensin Homolog siRNA Repairs Complete Spinal Cord Injury. **ACS Nano**, v. 13, n. 9, p. 10015–10028, 24 set. 2019.

HARBORNE, J. B.; GRAYER, R. J. The anthocyanins. Em: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The Flavonoids: Advances in Research since 1980**. Boston, MA: Springer US, 1988. p. 1–20.

HATA, A.; CHEN, Y.-G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 9, p. a022061, 9 jan. 2016.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, 8 fev. 2008.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HE, N. et al. Radiation Responses of Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Different Sources. **Dose-Response**, v. 17, n. 4, p. 1559325819893210, 1 out. 2019.

HEO, G. S. et al. Molecular Imaging Visualizes Recruitment of Inflammatory Monocytes and Macrophages to the Injured Heart. **Circulation Research**, v. 124, n. 6, p. 881–890, 15 mar. 2019.

HERMANKOVA, B. et al. Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- γ -treated mesenchymal stem cells. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 129–136, 1 fev. 2016.

HIRATA, T. et al. Associations of cardiovascular biomarkers and plasma albumin with exceptional survival to the highest ages. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3820, 30 jul. 2020.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 14, p. 2213–2219, 15 ago. 2010.

JAFRI, M. A. et al. Deciphering the Association of Cytokines, Chemokines, and Growth Factors in Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using an ex vivo Osteochondral Culture System. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, 2020.

JANA, A. et al. NF κ B is essential for activin-induced colorectal cancer migration via upregulation of PI3K-MDM2 pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 37377–37393, 18 mar. 2017.

JI, J. et al. JAK-STAT signaling mediates the senescence of bone marrow-mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 3, p. 208–215, 1 mar. 2017.

JIANG, L. et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate acute liver failure by reducing the activity of the NLRP3 inflammasome in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 508, n. 3, p. 735–741, 15 jan. 2019.

JIANG, W.; XU, J. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 1, p. e12712, jan. 2020.

JIE, L.-G.; YU, Q.-H. Kirenol Inhibits the Function and Inflammation of Fibroblast-like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis in vitro and in vivo. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

JIN, Q.-H. et al. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-conditioned media inhibited macrophages activation in vitro. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 4754, 19 mar. 2022.

JIN, X. et al. Cyanidin-3-glucoside Alleviates 4-Hydroxyhexenal-Induced NLRP3 Inflammasome Activation via JNK-c-Jun/AP-1 Pathway in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. e5604610, 30 abr. 2018.

KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. **Science**, v. 367, n. 6478, p. eaau6977, 7 fev. 2020.

KARUNAKARAN, D. et al. *RIPK1* Expression Associates With Inflammation in Early Atherosclerosis in Humans and Can Be Therapeutically Silenced to Reduce NF- κ B Activation and Atherogenesis in Mice. **Circulation**, v. 143, n. 2, p. 163–177, 12 jan. 2021.

KAVIANI, M. et al. Comparison of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Various Compartments of Human Adipose Tissue and Tunica Adventitia Layer of the Arteries Subsequent to Organ Donation. **International Journal of Organ Transplantation Medicine**, v. 10, n. 2, p. 65–73, 2019.

KELEPOURI, D. et al. The Role of Flavonoids in Inhibiting Th17 Responses in Inflammatory Arthritis. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. e9324357, 5 mar. 2018.

KIM, T.-W. et al. Anti-Inflammatory Mechanisms of Koreanaside A, a Lignan Isolated from the Flower of *Forsythia koreana*, against LPS-Induced Macrophage Activation and DSS-Induced Colitis Mice: The Crucial Role of AP-1, NF- κ B, and JAK/STAT Signaling. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1163, out. 2019.

KIMBALL, A. et al. Ly6C^{Hi} Blood Monocyte/Macrophage Drive Chronic Inflammation and Impair Wound Healing in Diabetes Mellitus. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 5, p. 1102–1114, maio 2018.

KNYAZEVA, O. V.; KAGRAMANOVA, A. V.; PARFENOV, A. I. Mesenchymal stem cell therapy in patients with Crohn's disease — 5 year follow-up. **Proceedings of the Latvian**

Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences., v. 76, n. 5–6, p. 618–622, 1 dez. 2022.

KONG, J.-M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923–933, 1 nov. 2003.

KOT, M. et al. The Importance of HLA Assessment in “Off-the-Shelf” Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Based-Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5680, jan. 2019.

KRAMPERA, M.; LE BLANC, K. Mesenchymal stromal cells: Putative microenvironmental modulators become cell therapy. **Cell Stem Cell**, v. 28, n. 10, p. 1708–1725, 7 out. 2021.

KURTE, M. et al. Time-dependent LPS exposure commands MSC immunoplasticity through TLR4 activation leading to opposite therapeutic outcome in EAE. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 416, 25 set. 2020.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, n. 3, p. 307–315, 2004.

LEE, H. J. et al. Effects of blue honeysuckle containing anthocyanin on anti-diabetic hypoglycemia and hyperlipidemia in ob/ob mice. **Journal of Functional Foods**, v. 89, p. 104959, 1 fev. 2022.

LEE, H.-J.; JUNG, H.; KIM, D.-K. IDO and CD40 May Be Key Molecules for Immunomodulatory Capacity of the Primed Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5772, jan. 2021.

LEE, S. et al. Enhancement of anti-inflammatory and immunomodulatory effects of adipose-derived human mesenchymal stem cells by making uniform spheroid on the new nano-patterned plates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 552, p. 164–169, 7 maio 2021.

LEI, Q. et al. Extracellular vesicles deposit PCNA to rejuvenate aged bone marrow-derived mesenchymal stem cells and slow age-related degeneration. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 578, p. eaaz8697, 27 jan. 2021.

LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. et al. Anthocyanin-rich bilberry extract induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells via redox-sensitive epigenetic modifications. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 227–234, maio 2018.

LI, J. et al. Dual-target IL-12-containing nanoparticles enhance T cell functions for cancer immunotherapy. **Cellular Immunology**, v. 349, p. 104042, 1 mar. 2020a.

LI, L. et al. Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 6234, 29 ago. 2014.

LI, L. et al. Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106939, nov. 2020b.

LI, N. et al. Comparative Evaluation of Cytotoxicity and Antioxidative Activity of 20 Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3876–3883, 1 maio 2008.

LI, N.; HUA, J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 13, p. 2345–2360, 1 jul. 2017.

LI, X. et al. IFN γ and TNF α synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 18, 11 jan. 2019.

LIAO, X. et al. SETD4 in the Proliferation, Migration, Angiogenesis, Myogenic Differentiation and Genomic Methylation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 17, n. 4, p. 1374–1389, 1 ago. 2021.

LIM, Y. J. et al. Antioxidant Contributors in Seed, Seed Coat, and Cotyledon of γ -ray-Induced Soybean Mutant Lines with Different Seed Coat Colors. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 353, mar. 2021.

LIU, C. et al. Mesenchymal stem cells pretreated with proinflammatory cytokines accelerate skin wound healing by promoting macrophages migration and M2 polarization. **Regenerative Therapy**, v. 21, p. 192–200, 1 dez. 2022.

LIU, J. et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Enhancing Angiogenesis through Delivering Angiopoietin-2. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 17, n. 2, p. 305–317, 1 abr. 2021a.

LIU, J.; LIU, Q.; CHEN, X. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Regulatory B Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 14 jul. 2017.

LIU, W. et al. IL-6 promotes metastasis of non-small-cell lung cancer by up-regulating TIM-4 via NF- κ B. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 3, p. e12776, 2020.

LIU, Y. et al. Cyanidin-3-O- β -glucoside polarizes LPS-induced M1 into M2 Macrophage in J774 cells via PPAR γ -mediated NF- κ B and STAT6 signaling pathway. **Journal of Functional Foods**, v. 77, p. 104314, 1 fev. 2021b.

LIU, Y. et al. IL-2 regulates tumor-reactive CD8⁺ T cell exhaustion by activating the aryl hydrocarbon receptor. **Nature Immunology**, v. 22, n. 3, p. 358–369, mar. 2021c.

LONG, N. et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. **Cancer Science**, v. 104, n. 3, p. 298–303, 2013.

LUZ-CRAWFORD, P. et al. Mesenchymal Stem Cells Repress Th17 Molecular Program through the PD-1 Pathway. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45272, 17 set. 2012.

LYNCH, K. et al. TGF- β 1-Licensed Murine MSCs Show Superior Therapeutic Efficacy in Modulating Corneal Allograft Immune Rejection In Vivo. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 9, p. 2023–2043, 2 set. 2020.

MA, Y. et al. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Food Control**, v. 106, p. 106712, 1 dez. 2019.

MAGATTI, M. et al. B Lymphocytes as Targets of the Immunomodulatory Properties of Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

MALVICINI, R. et al. Macrophage bioassay standardization to assess the anti-inflammatory activity of mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles. **Cytotherapy**, v. 24, n. 10, p. 999–1012, 1 out. 2022.

MANDAL, S. et al. Encapsulated human mesenchymal stem cells (eMSCs) as a novel anti-cancer agent targeting breast cancer stem cells: Development of 3D primed therapeutic MSCs. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 110, p. 59–69, 1 maio 2019.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, 1 ago. 2002.

MAXIMOW, A. A. RELATION OF BLOOD CELLS TO CONNECTIVE TISSUES AND ENDOTHELIUM. **Physiological Reviews**, v. 4, n. 4, p. 533–563, 1 out. 1924.

MAZEWSKI, C.; KIM, M. S.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Anthocyanins, delphinidin-3-O-glucoside and cyanidin-3-O-glucoside, inhibit immune checkpoints in human colorectal cancer cells in vitro and in silico. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11560, 9 ago. 2019.

MAZZA, G. **Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains**. Boca Raton: CRC Press, 2017.

MAZZA, G.; FRANCIS, F. J. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 341–371, 1 jul. 1995.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, jul. 2008.

MELIEF, S. M. et al. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 2, n. 6, p. 455–463, 1 jun. 2013.

MENEES, K. B. et al. Sex- and age-dependent alterations of splenic immune cell profile and NK cell phenotypes and function in C57BL/6J mice. **Immunity & Ageing**, v. 18, n. 1, p. 3, 8 jan. 2021.

Mesenchymal stem cells | United States - List Results - ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Mesenchymal+stem+cells&cntry=US&state=&city=&dist=>>>. Acesso em: 12 mar. 2023.

MITCHELL, J. A. et al. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 1, p. 141–147, 2008.

MORTADA, I.; MORTADA, R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. **European Journal of Medical Genetics**, v. 61, n. 2, p. 114–118, 1 fev. 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MSC Trials 2011-2022. Disponível em: <<https://celltrials.org/public-cells-data/msc-trials-2011-2018/65>>. Acesso em: 12 mar. 2023.

MULLINS, G. N. et al. T cell signaling and Treg dysfunction correlate to disease kinetics in IL-2R α -KO autoimmune mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21994, 15 dez. 2020.

MUSIAL-WYSOCKA, A.; KOT, M.; MAJKA, M. The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. **Cell transplantation**, v. 28, n. 7, p. 801–812, 2019.

NADEEM, A. et al. Dysregulation in IL-6 receptors is associated with upregulated IL-17A related signaling in CD4⁺ T cells of children with autism. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 97, p. 109783, 8 mar. 2020.

NAJAR, M. et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. **Cellular Immunology**, v. 264, n. 2, p. 171–179, 1 jan. 2010.

NAM, D. C. et al. Cytoprotective Mechanism of Cyanidin and Delphinidin against Oxidative Stress-Induced Tenofibroblast Death. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 426–432, jul. 2016.

NAUTA, A. J. et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34⁺-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells¹. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2080–2087, 15 ago. 2006.

NAVARRO, F. et al. Moderate exercise increases the metabolism and immune function of lymphocytes in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 5, p. 1343–1352, 1 maio 2013.

NEVES, B. R. O. et al. Delphinidin-3-O-glucoside in vitro suppresses NF- κ B and changes the secretome of mesenchymal stem cells affecting macrophage activation. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 105, p. 111853, jan. 2023.

NI, K. et al. PD-1/PD-L1 Pathway Mediates the Alleviation of Pulmonary Fibrosis by Human Mesenchymal Stem Cells in Humanized Mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 58, n. 6, p. 684–695, jun. 2018.

NIKBAKHT, E. et al. Potential of anthocyanin as an anti-inflammatory agent: a human clinical trial on type 2 diabetic, diabetic at-risk and healthy adults. **Inflammation Research**, v. 70, n. 3, p. 275–284, 1 mar. 2021.

ORTIZ-VIRUMBRALES, M. et al. Human adipose mesenchymal stem cells modulate myeloid cells toward an anti-inflammatory and reparative phenotype: role of IL-6 and PGE2. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 462, 2 nov. 2020.

PANICKER, N. et al. Fyn kinase regulates misfolded α -synuclein uptake and NLRP3 inflammasome activation in microglia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 216, n. 6, p. 1411–1430, 29 abr. 2019.

PARIJS, L. V.; ABBAS, A. K. Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes off. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 243–248, 10 abr. 1998.

PARK, K. H. et al. Dual Role of Cyanidin-3-glucoside on the Differentiation of Bone Cells. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 12, p. 1676–1683, dez. 2015.

PERETS, N. et al. Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice. **Molecular Autism**, v. 9, n. 1, p. 57, 21 nov. 2018.

PINHO, A. G. et al. Immunomodulatory and regenerative effects of the full and fractioned adipose tissue derived stem cells secretome in spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 351, p. 113989, 1 maio 2022.

PREVOSTO, C. et al. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. **Haematologica**, v. 92, n. 7, p. 881–888, 1 jul. 2007.

PRINSI, B. et al. Insight into Composition of Bioactive Phenolic Compounds in Leaves and Flowers of Green and Purple Basil. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 22, jan. 2020.

QI, S. S. et al. Cyanidin-3-glucoside from black rice prevents renal dysfunction and renal fibrosis in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104062, 1 set. 2020.

QIU, G. et al. Degradation kinetics and antioxidant capacity of anthocyanins in air-impingement jet dried purple potato slices. **Food Research International**, v. 105, p. 121–128, 1 mar. 2018.

QU, Y. et al. Kaempferol Alleviates Murine Experimental Colitis by Restoring Gut Microbiota and Inhibiting the LPS-TLR4-NF- κ B Axis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

RACHEL, M. et al. Exhaled nitric oxide in pediatric patients with respiratory disease. **Journal of Breath Research**, v. 13, n. 4, p. 046007, jul. 2019.

RAGNI, E. et al. Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 165, 28 abr. 2020.

RAHBARGHAZI, R. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells and condition media diminish inflammatory adhesion molecules of pulmonary endothelial cells in an ovalbumin-induced asthmatic rat model. **Microvascular Research**, v. 121, p. 63–70, 1 jan. 2019.

RAHIM, S. S. et al. Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in RAW 264.7 cells also involves c-rel transcription factor. **Immunology**, v. 114, n. 3, p. 313–321, 2005.

RAHMAN, S. et al. Health benefits of cyanidin-3-glucoside as a potent modulator of Nrf2-mediated oxidative stress. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 907–923, 1 ago. 2021.

RAO, V. et al. Mesenchymal stem cells-bridge catalyst between innate and adaptive immunity in COVID 19. **Medical Hypotheses**, v. 143, p. 109845, 1 out. 2020.

REGMI, S. et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. **European Journal of Cell Biology**, v. 98, n. 5, p. 151041, 1 dez. 2019.

REGMI, S. et al. Heterospheroid formation improves therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells in murine colitis through immunomodulation and epithelial regeneration. **Biomaterials**, v. 271, p. 120752, 1 abr. 2021.

RENAVIKAR, P. S. et al. IL-12-Induced Immune Suppressive Deficit During CD8+ T-Cell Differentiation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

RUIBIN, J.; BO, J.; DAYNING, W. **Cardamonin induces G2/M phase arrest and apoptosis through inhibition of NF- κ B and mTOR pathways in ovarian cancer - PMC.**

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7803546/>>. Acesso em: 6 maio. 2023.

SALDAÑA, L. et al. Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 58, 13 fev. 2019.

SAMARPITA, S.; RASOOL, M. Cyanidin restores Th17/Treg balance and inhibits T follicular helper cell differentiation via modulation of ROCK2 signaling in an experimental model of rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 108359, 1 dez. 2021.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAULITE, L. et al. Effects of malvidin, cyanidin and delphinidin on human adipose mesenchymal stem cell differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. **Phytomedicine**, v. 53, p. 86–95, 1 fev. 2019.

SCHENA, F. et al. Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2776–2786, 2010.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 921–928, 26 dez. 1986.

SENEGAGLIA, A. C. et al. Combined Use of Tocilizumab and Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Severe Covid-19: Case Report. **Cell Transplantation**, v. 30, p. 09636897211021008, 1 jan. 2021.

SHABBIR, A. et al. Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, n. 5, p. H1428–H1438, nov. 2010.

SHAHIR, M. et al. Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 10, p. 7043–7055, 2020.

SHARMA, R. et al. Exosomes Secreted by Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cell Attenuate Diabetes in Mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2021, p. e9534574, 10 dez. 2021.

SHOKRI, M.-R. et al. Human menstrual blood-derived stromal/stem cells modulate functional features of natural killer cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10007, 10 jul. 2019.

SINGH, S. S. et al. NF- κ B-Mediated Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Potential Therapeutic Effect of Polyphenols. **Neurotoxicity Research**, v. 37, n. 3, p. 491–507, 1 mar. 2020.

SIVASINPRASASN, S. et al. Cyanidin-3-glucoside attenuates angiotensin II-induced oxidative stress and inflammation in vascular endothelial cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 67–74, 25 dez. 2016.

SOCHOCKA, M.; DINIZ, B. S.; LESZEK, J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8071–8089, 1 dez. 2017.

SPENDER, L. C. et al. Preclinical Evaluation of AZ12601011 and AZ12799734, Inhibitors of Transforming Growth Factor β Superfamily Type 1 Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 95, n. 2, p. 222–234, 1 fev. 2019.

STODOLA, J. L.; BURGERS, P. M. Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond timescale. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 5, p. 402–408, maio 2016.

STRACK, D.; WRAY, V. 9 - Anthocyanins. Em: HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**. Plant Phenolics. [s.l.] Academic Press, 1989. v. 1p. 325–356.

SU, S. et al. Tea Polyphenols Reducing Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Responses in RAW264.7 Macrophages via NF- κ B Pathway. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 35, n. 6, p. 1105–1110, dez. 2019a.

SU, X. et al. Identification and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato leaves. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01964, 1 jun. 2019b.

SUN, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 545–558, set. 2017.

SUN, Y. et al. Interleukin-10 inhibits interleukin-1 β production and inflammasome activation of microglia in epileptic seizures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 66, 28 mar. 2019.

SUZDAL'TSEVA, Y. et al. Equilibrium among Inflammatory Factors Determines Human MSC-Mediated Immunosuppressive Effect. **Cells**, v. 11, n. 7, p. 1210, jan. 2022.

SZIKSZ, E. et al. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. e764641, 24 jun. 2015.

TAGO, Y. et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells attenuate xenogeneic graft-versus-host disease by preventing T cell activation and proliferation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 2406, 28 jan. 2021.

TAKESHITA, Y. et al. New BBB Model Reveals That IL-6 Blockade Suppressed the BBB Disorder, Preventing Onset of NMOSD. **Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation**, v. 8, n. 6, 1 nov. 2021.

TANG, H. et al. Targeting L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in pulmonary arterial hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 7, n. 3, p. 569–571, 1 set. 2017.

TATARA, R. et al. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. **Cytotherapy**, v. 13, n. 6, p. 686–694, 1 jul. 2011.

TOBIN, L. M. et al. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4⁺ T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 172, n. 2, p. 333–348, 1 maio 2013.

TOMMY, T. et al. Effect of folinic acid on serum homocysteine, TNF α , IL-10, and HMGB1 gene expression in head injury model. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 65, p. 102273, 1 maio 2021.

TONG, Y. et al. Stability and structural characteristics of amylopectin nanoparticle-binding anthocyanins in *Aronia melanocarpa*. **Food Chemistry**, v. 311, p. 125687, 1 maio 2020.

TORABIAN, G. et al. Anti-influenza activity of elderberry (*Sambucus nigra*). **Journal of Functional Foods**, v. 54, p. 353–360, mar. 2019.

TRARES, K.; ACKERMANN, J.; KOCH, I. The canonical and non-canonical NF- κ B pathways and their crosstalk: A comparative study based on Petri nets. **Biosystems**, v. 211, p. 104564, 1 jan. 2022.

TSE, W. T. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v. 75, n. 3, p. 389, 15 fev. 2003.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B**, v. 851, n. 1–2, p. 51–70, maio 2007.

V, A. B.; ELENA, E.; R, Z. A. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. **Cellular Therapy and Transplantation**, v. 1, n. 3, p. 35–38, 2009.

VASILEV, G. et al. Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate Th17 and increase Treg cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology International**, v. 39, n. 5, p. 819–826, maio 2019.

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

VUGIC, L. et al. Anthocyanin supplementation inhibits secretion of pro-inflammatory cytokines in overweight and obese individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103596, 1 jan. 2020.

WANG, F. et al. Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity. **EBioMedicine**, v. 30, p. 303–316, 1 abr. 2018.

WANG, H. et al. Potential therapeutic effects of cyanidin-3-O-glucoside on rheumatoid arthritis by relieving inhibition of CD38+ NK cells on Treg cell differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 21, n. 1, p. 220, 28 out. 2019a.

WANG, L.-S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, Natural Products Special Issue. v. 269, n. 2, p. 281–290, 8 out. 2008.

WANG, M. et al. Mesenchymal stem cell secretions improve donor heart function following ex vivo cold storage. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 163, n. 4, p. e277–e292, 1 abr. 2022.

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

WANG, Y. et al. The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I. **iScience**, v. 15, p. 66–78, 31 maio 2019b.

WANG, Z. et al. Comprehensive proteomic analysis of exosomes derived from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 511, 27 nov. 2020.

WITWER, K. W. et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1609206, 1 dez. 2019.

WONGWICHAI, T. et al. Anthocyanins and metabolites from purple rice inhibit IL-1 β -induced matrix metalloproteinases expression in human articular chondrocytes through the NF- κ B and ERK/MAPK pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 112, p. 108610, 1 abr. 2019.

WOODS, K. et al. Mismatch in epitope specificities between IFN γ inflamed and uninflamed conditions leads to escape from T lymphocyte killing in melanoma. 24 jan. 2023.

WORTHINGTON, J. J. et al. Loss of the TGF β -Activating Integrin α v β 8 on Dendritic Cells Protects Mice from Chronic Intestinal Parasitic Infection via Control of Type 2 Immunity. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003675, 3 out. 2013.

WU, R. et al. Enhanced alleviation of aGVHD by TGF- β 1-modified mesenchymal stem cells in mice through shifting M Φ into M2 phenotype and promoting the differentiation of Treg cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 2, p. 1684–1699, 2020a.

WU, T. et al. Mesenchymal stem cells alleviate AQP-4-dependent glymphatic dysfunction and improve brain distribution of antisense oligonucleotides in BACHD mice. **Stem Cells**, v. 38, n. 2, p. 218–230, 1 fev. 2020b.

XIA, C. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 143, p. 1–15, 1 nov. 2019.

XIONG, G. et al. Quercetin Inhibits Inflammatory Response Induced by LPS *from Porphyromonas gingivalis* in Human Gingival Fibroblasts via Suppressing NF- κ B Signaling Pathway. **BioMed Research International**, v. 2019, p. e6282635, 20 ago. 2019.

XUE, L. et al. Anti-inflammatory Activities of Cranberry Fruit Extracts in Human THP-1 Monocytes are Influenced by Their Phytochemical Composition. **ACS Food Science & Technology**, v. 2, n. 1, p. 75–83, 21 jan. 2022.

YAMADA, T. et al. The role of CDK8 in mesenchymal stem cells in controlling osteoclastogenesis and bone homeostasis. **Stem Cell Reports**, v. 17, n. 7, p. 1576–1588, 12 jul. 2022.

YANG, R. et al. A subset of IL-17+ mesenchymal stem cells possesses anti-Candida albicans effect. **Cell Research**, v. 23, n. 1, p. 107–121, jan. 2013.

YANG, T. et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, n. 4, p. 179–184, 15 nov. 2006.

YAO, Y. et al. Cyanidin-3-O- β -Glucoside Attenuates Platelet Chemokines and Their Receptors in Atherosclerotic Inflammation of ApoE^{-/-} Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 27, p. 8254–8263, 13 jul. 2022.

YEO, R. W. Y. et al. Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Exosomes; a key to delivering genetic materials. v. 65, n. 3, p. 336–341, 1 mar. 2013.

YU, H. et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–23, 21 set. 2020.

YU, T. et al. Exosomes secreted from miRNA-29b-modified mesenchymal stem cells repaired spinal cord injury in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, p. e8735, 5 dez. 2019.

YUAN, J. et al. Protective Effect of Genistein on Condylar Cartilage through Downregulating NF- κ B Expression in Experimentally Created Osteoarthritis Rats. **BioMed Research International**, v. 2019, p. e2629791, 30 dez. 2019.

ZHANG, K. et al. A nitric oxide-releasing hydrogel for enhancing the therapeutic effects of mesenchymal stem cell therapy for hindlimb ischemia. **Acta Biomaterialia**, v. 113, p. 289–304, 1 set. 2020a.

ZHANG, L. et al. Anti-inflammatory effect of lipophilic grape seed proanthocyanidin in RAW 264.7 cells and a zebrafish model. **Journal of Functional Foods**, v. 75, p. 104217, 1 dez. 2020b.

ZHANG, P. et al. Enzymatic acylation of cyanidin-3-glucoside with fatty acid methyl esters improves stability and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 343, p. 128482, 1 maio 2021a.

ZHANG, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **MedComm**, v. 2, n. 4, p. 618–653, 2021b.

ZHANG, X. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells paracrine TGF- β 1 to mediate the biological activity of osteoblasts in bone repair. **Cytokine**, v. 164, p. 156139, 1 abr. 2023.

ZHANG, Y. et al. Stability and colour characteristics of PEF-treated cyanidin-3-glucoside during storage. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 669–676, 15 jan. 2008.

ZHANG, Y. et al. Neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells against cerebral ischemia are mediated in part by an anti-apoptotic mechanism. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 4, p. 597–604, abr. 2019a.

ZHANG, Y.; VAREED, S. K.; NAIR, M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. **Life Sciences**, v. 76, n. 13, p. 1465–1472, 11 fev. 2005.

ZHANG, Z. et al. Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2. **EBioMedicine**, v. 45, p. 341–350, 1 jul. 2019b.

ZHANG, Z. et al. Sodium alginate/collagen hydrogel loaded with human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes wound healing and skin remodeling. **Cell and Tissue Research**, v. 383, n. 2, p. 809–821, 1 fev. 2021c.

ZHAO, H. et al. Resveratrol inhibits inflammation after spinal cord injury via SIRT-1/NF- κ B signaling pathway. **Neuroscience Letters**, v. 762, p. 136151, 25 set. 2021.

ZHAO, J. et al. Cyanidin-3-glucoside attenuates silica-induced pulmonary inflammatory responses by modulating T cell immune responses and STAT1/STAT3 signaling. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103911, 1 maio 2020.

ZHONG, W. et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote the growth and drug-resistance of diffuse large B-cell lymphoma by secreting IL-6 and elevating IL-17A levels. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 73, 12 fev. 2019.

9 ANEXOS

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9142 - 10140812/1 - Sumara de Freitas

Email: sumara.freitas@usp.br
Data de Nascimento: 12/06/1991
Cédula de Identidade: RG - 48.023.833-9 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Biomedicina - Universidade de Santo Amaro - São Paulo - Brasil - 2019

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 01/02/2021
Início da Contagem de Prazo: 01/02/2021
Data Limite para o Depósito: 01/08/2023
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 01/02/2021 até o presente. Email: hemato@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 01/02/2021
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 24/02/2022
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/02/2021

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2023

Impresso em: 23/05/2023 01:59:11



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9142 - 10140812/1 - Sumara de Freitas

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5712-3/1	Biotecnologia de Produtos Naturais	22/03/2021	07/05/2021	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
PSA5866-5/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	23/03/2021	03/05/2021	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
5925884-3/5	Ensino Superior: Contexto, Produção de Conhecimento e Docência (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	23/03/2021	01/06/2021	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5793-14/5	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	23/03/2021	05/07/2021	15	1	100	A	N	Concluída
RPA5741-5/1	Patologia Oncológica e Molecular I (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	26/03/2021	08/07/2021	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5772-8/2	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	29/03/2021	25/04/2021	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
6046038-3/1	Tópicos em Câncer: da Biologia à Terapia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	29/03/2021	25/04/2021	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
SRB5041-2/1	Fundamentos em Ensaio Celulares (Curso Interunidades: Bioengenharia - Universidade de São Paulo)	30/03/2021	12/07/2021	120	8	100	A	N	Concluída
BIE5755-5/3	Comunicação Oral (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/04/2021	18/04/2021	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
8035809-1/2	Biologia e Função das Células-Tronco em Tecidos Normais e Neoplásicos (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	07/04/2021	19/05/2021	60	4	100	A	N	Concluída
ODO5785-5/2	Inglês para Apresentações Oraís e Escrita Acadêmica (Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo)	08/04/2021	30/06/2021	60	4	96	A	N	Concluída
FBA5905-2/4	Planejamento Experimental e Análise Multivariada	13/04/2021	26/07/2021	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5755-4/1	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	14/04/2021	18/05/2021	30	0	-	-	N	Turma cancelada
5965021-3/2	Docência no Ensino Superior: Fundamentos Teórico-Metodológicos (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	14/05/2021	23/07/2021	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5805-3/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2021	10/10/2021	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/7	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	12/08/2021	24/11/2021	15	1	100	A	N	Concluída
BMI5904-4/1	Reconhecimento Molecular pelo Sistema Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	28/03/2022	10/04/2022	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5779-4/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	01/04/2022	02/06/2022	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
MCM5772-9/1	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	04/04/2022	01/05/2022	60	4	90	B	N	Concluída
BMI5905-4/1	Mecanismos Efetores da Resposta Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	18/04/2022	01/05/2022	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMI5911-1/1	Fisiologia e Patologia do Inflamassoma (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	30/05/2022	12/06/2022	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BTC5800-2/2	Anticorpos Monoclonais e Futuros Desafios (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	06/06/2022	19/06/2022	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5719-5/1	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	12/08/2022	24/11/2022	90	0	-	-	N	Turma cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	38
Estágios:			
Total:	0	25	38

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2023

Impresso em: 23/05/2023 01:59:11

ANEXO B



Sumara de Freitas



Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2107372342199060>

ID Lattes: 2107372342199060


Última atualização do currículo em 03/12/2022

Graduada em Biomedicina pela Universidade Santo Amaro como bolsista do Programa Universidade para Todos (PROUNI). Possui habilitação em Imunologia e conhecimentos em técnicas de Biologia Molecular. Mestranda em Ciências na área de Fisiopatologia com bolsa CNPq pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) no Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia com o projeto "Influência da Cianidina como potencial modulador da capacidade imunorregulatória das Células Tronco Mesenquimais". Possui conhecimento em hematologia sobre os tópicos de fisiologia do sistema hematopoético, biologia de células-tronco mesenquimais, e em técnicas de biologia molecular como Extração de RNA, síntese de cDNA, RT-PCR e Western Blotting. Já em imunologia possui experiência em imunorregulação e em técnicas como Citometria de fluxo e ELISA. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Sumara de Freitas 
Nome em citações bibliográficas	FREITAS, S.;FREITAS, S;FREITAS, SUMARA DE
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/2107372342199060
Orcid iD	 https://orcid.org/0000-0001-8762-4374

Formação acadêmica/titulação

2021	Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Influência da cianidina como potencial modulador da capacidade imunoregulatória das células tronco mesenquimais. Orientador:  Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: Cianidina; Célula tronco mesenquimal; Imunoregulação. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Biologia molecular. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia / Subárea: Hematologia.
2014 - 2018	Graduação em Biomedicina. Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil. Título: Microambiente tumoral de Glioblastoma. Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbutto. Bolsista do(a): Programa Universidade para Todos, PROUNI, Brasil.
2007 - 2009	Ensino Médio (2º grau). Guaracy Silveira, ETEC, Brasil.

Formação Complementar

2022 - 2022	Extensão universitária em Capacidade no Uso e Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2022 - 2022	Imunologia Clínica. (Carga horária: 15h). Sociedade Brasileira de Imunologia, SBI, Brasil.

2021 - 2021	Utilização da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais. (Carga horária: 1h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil.
2020 - 2020	Ciclo de Palestras em Fisiopatologia e Toxicologia (FisioTox). (Carga horária: 15h). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil.
2020 - 2020	Curso de Verão em Bioinformática. (Carga horária: 30h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2018 - 2018	Extensão universitária em Biomedicina. (Carga horária: 192h). Projeto RONDON (SP), RONDON, Brasil.
2017 - 2017	Extensão universitária em Extensão Universitária Ilha do Cardoso. (Carga horária: 72h). Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.
2016 - 2016	Biossegurança. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2016 - 2016	Respostas ao dano no DNA: Implicações em Evolução, Envelhecimento e Câncer. (Carga horária: 50h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2015 - 2015	Extensão universitária em XXX Feira da Saúde e Cidadania. (Carga horária: 5h). Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.
2015 - 2015	Conceitos e Inovações em Imunologia. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2015 - 2015	Citometria de Fluxo. (Carga horária: 4h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2015 - 2015	Noções Básicas de Soros e Vacinas. (Carga horária: 4h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2014 - 2014	Extensão universitária em Dia da Saúde Jardim Lucélia. (Carga horária: 8h). Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.

Atuação Profissional

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil.

Vínculo institucional

2022 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 6, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Monitora pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Disciplina: FBC601-1 - Hematologia Geral do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo(USP), sob a supervisão do Prof. Ricardo Ambrósio Fock.

Vínculo institucional

2022 - 2022

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 6, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Monitora pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Disciplina: FBC052-2 Fisiologia do Sistema Hematopoético, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), sob a supervisão do Prof. Ricardo Ambrósio Fock.

Vínculo institucional

2021 - 2021

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 6, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações

Monitora pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Disciplina: FBC601-1 - Hematologia Geral do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), sob a supervisão do Prof. Ricardo Ambrósio Fock.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2018 - 2019

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno, Carga horária: 15
Aluna de Iniciação científica no Laboratório de Imunologia de Tumores. Departamento de Imunologia do ICB IV. Experiência em: cultura celular de células tumorais modelo em monocamada e em 3D, Elisa, diferenciação de monócitos em células dendríticas e citometria de fluxo.

Vínculo institucional

2016 - 2017

Outras informações

Vínculo: Aluno, Enquadramento Funcional: Estágio extracurricular, Carga horária: 12
Estágio extracurricular do Laboratório de Oncovirologia, Departamento de Microbiologia do ICB II. Experiência em: cultura celular de células tumorais associadas a HPV (curva de crescimento, viabilidade celular, ensaio clonogênico, ensaio de soft ágar, ensaio de oncosfera), construções de primers, técnicas de extração de DNA e RNA, técnica de PCR, técnica de western blot e citometria de fluxo.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FMUSP, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2015

Outras informações

Vínculo: Estágio extracurricular, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 15, Regime: Dedicção exclusiva.
Estágio no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM25 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em Biologia Molecular.

Projetos de pesquisa

2021 - Atual

Influência da cianidina como potencial modulador da capacidade imunoregulatória das células tronco mesenquimais
Descrição: As células tronco mesenquimais (CTM) tem atraído cada vez mais atenção devido sua capacidade terapêutica. As CTMs apresentam capacidade de modular a atividade de células do sistema imune, bem como a produção de fatores solúveis, como as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Alguns estudos sugerem que as CTMs apresentam característica imunossupressora, uma vez que essas células possam inibir a diferenciação e proliferação de células imunológicas, inibir a ativação do sistema complemento pela síntese do fator H, além de exercerem ação inibitória em diferentes tipos celulares como linfócitos B e T, natural killer e células dendríticas. Adicionalmente, a capacidade imunoregulatória podem apresentar perfil pró e anti-inflamatória, angiogênico, anti-apoptótico e fibrótico, além de apresentar secreção de moléculas solúveis e interação célula-célula, acarretando a inibição e proliferação de diversas células imunes. Devido a isso, muitos estudos são relacionados visando utilizá-las em seus tratamentos como doenças autoimunes, neoplasias, doenças inflamatórias e infecciosas. Estas também controlam o nicho hematopoético, juntamente com a matriz extracelular, através das mesmas substâncias liberadas. Sabendo-se que as antocianinas são pigmentos naturais, presentes em vários alimentos e possuem ações bioativas e dentre essas antocianinas destaca-se a Cianidina 3-glicosilada que apresenta capacidade de modular diversos processos como migração e invasão celular de células malignas, além de possuir atuação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, pretende-se nesse projeto investigar os efeitos da cianidina em modular a capacidade imunoregulatória das CTMs.
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Sumara de Freitas - Coordenador / Ricardo Ambrósio Fóck - Integrante / Bruna Roberta Oliveira Neves - Integrante / Carlos Eduardo da Silva Gonçalves - Integrante.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Células dendríticas na Imunoterapia do Glioblastoma

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) .

2018 - 2018

Integrantes: Sumara de Freitas - Integrante / José Alexandre Marzagão Barbuto - Coordenador / Nadia Emely Chauca Torres - Integrante.
 Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

Áreas de atuação

- | | |
|----|--|
| 1. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Hematologia. |
| 2. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Imunologia Celular. |
| 3. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Biologia Molecular. |

Idiomas

Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- | | |
|------|---|
| 2022 | 1º Lugar na apresentação do pôster "Effects of cyanidin-3-glucoside on the immunomodulatory action of Mesenchymal Stem Cell", Simpósio dos 50 anos do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Fisiopatologia e Toxicologia. |
|------|---|

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

- NEVES, BRUNA ROBERTA OLIVEIRA ; FREITAS, SUMARA DE ; BORELLI, PRIMAVERA ; ROGERO, MARCELO MACEDO ; FOCK, RICARDO AMBROSIO . Delphinidin-3-O-glucoside in vitro suppresses NFκB and changes the secretome of mesenchymal stem cells affecting macrophage activation. *NUTRITION JCR*, v. 1, p. 111853, 2022.
 Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 1
- HERBSTER, S ; PALADINO, A ; FREITAS, S ; BOCCARDO, E . Alterations in the expression and activity of extracellular matrix components in HPV-associated infections and diseases. *Clinics JCR*, v. 73, p. 01-07, 2018.
 Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 10

Apresentações de Trabalho

- ★ FREITAS, S.; MAKIYAMA, E. N. ; NEVES, B. R. O. ; GONÇALVES, C. E. S. ; FOCK, R. A. . Cyanidin downregulates the secretion of inflammatory cytokines in Mesenchymal Stem Cells. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- GONÇALVES, C. E. S. ; SILVA, R. O. ; HASTREITER, A. A. ; VIVIAN, G. K. ; MAKIYAMA, E. N. ; FREITAS, S. ; FOCK, R. A. . Aging leads to reduced CD73 Expression on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- ★ FREITAS, S.; MAKIYAMA, E. N. ; NEVES, B. R. O. ; GONÇALVES, C. E. S. ; FOCK, R. A. . Effects of cyanidin-3-glucoside in the secretome of mesenchymal stem cells. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- FREITAS, S.; MAKIYAMA, E. N. ; NEVES, B. R. O. ; GONÇALVES, C. E. S. ; FOCK, R. A. . Effects of cyanidin-3-glucoside on the immunomodulatory action of Mesenchymal Stem Cell. 2022. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 16º Simpósio de Gestão em Unidades de Hemoterapia. 2022. (Simpósio).
2. Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022. 2022. (Congresso).
3. Simpósio em comemoração dos 50 anos do Programa de Pós-graduação em Farmácia- Fisiopatologia e Toxicologia. 2022. (Simpósio).
4. XLVI Congress of the Brazilian Society of Immunology IMMUNOMETABOLISM 2022. 2022. (Congresso).
5. XXI Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. 2022. (Congresso).
6. Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). 2021. (Congresso).
7. Innovations in Clinical Flow Cytometry. 2021. (Outra).
8. 49th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology- Fragment Screening in Drug Discovery. 2020. (Simpósio).
9. Innovation in Cancer Research Symposium. 2016. (Simpósio).
10. 18º Congresso de Iniciação Científica e 12º Amostra de Pós-Graduação. 2015. (Congresso).
11. Next generation sequencing - Hepatology study group -Introdução e definições. 2015. (Outra).
12. SIBBAS - Semana de Inovações Biológicas e Biotecnológicas Aplicadas à Saúde. 2015. (Outra).
13. XXXII Semana Acadêmica de Biomedicina na UNISA. 2015. (Congresso).
14. IX Simpósio Lipídeos e Saúde. 2014. (Simpósio).
15. XXXI Semana Acadêmica de Biomedicina da UNISA. 2014. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **FREITAS, S.** II Ciclo de Palestra da FisiTox, do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). 2021. (Outro).
2. **FREITAS, S.** XXXI Semana Acadêmica de Biomedicina da UNISA. 2014. (Outro).