

## Effects on expression of B lymphocyte transmembrane ligand genes after treatment with Rose extract

### Efeitos sobre a expressão de genes ligando transmembranar de linfócitos B após tratamento com extrato de Rosa

Mark Christopher Arokiaraj<sup>1</sup>   & Eric Menesson<sup>2</sup>

**Keywords:** Rose extract, B lymphocytes, CD30, CCR5

**Palavras-chave:** Extrato de rosa, linfócitos B, CD30, CCR5

#### To Cite:

Arokiaraj, M.C. & Menesson, E. (2023) Effects on expression of B lymphocyte transmembrane ligand genes after treatment with Rose extract. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(2), 1-11.

 [10.19277/bbr.20.2.317](https://doi.org/10.19277/bbr.20.2.317)

1 - Pondicherry Institute of Medical Sciences, Kalapet, Puducherry, India

2 - Tebubio, Le Perray en Yvelines, France

Correspondence to / Correspondência a:  
[christomark@gmail.com](mailto:christomark@gmail.com)

Received / Recebido: 18/05/2023  
Accepted / Aceite: 30/09/2023

#### Abstract

The goal was to evaluate the role of red rose extract (Pierre de Ronsard) on the human B lymphocytes gene CD20, CD30, CD40, and CCR5 expression. Red rose extract was prepared at the dilution of 0.0075% (v/v) and stored until use at -20°C. Cell treatment was performed at 37°C on human B cells. Cells were plated in 6 well plates at 1.5x10<sup>6</sup> cells per well and stored at -80°C and total RNA extracted. RTq-PCR was performed according to Genecopoeia. The cycle threshold method ( $\Delta\Delta Ct$ ) was used for data analysis. The comparative Ct method quantification ( $2^{-\Delta Ct}$ ) and fold change for CD20, CD30, CD40 and CCR5 were - 5.65E+01, 4.80E-01, N/A, 2.47E-01; and 0.954, 0.377, N/A and 0.577, respectively. The amount of total RNA extracted from about 4.5x10<sup>6</sup> cells was low and did not allow us to measure the RNA profile. With the exception of CD40, all other genes were expressed and well-measured in both B cell samples by qRT-PCR. The expression of CD30 and CCR5 genes were decreased in B lymphocytes *in vitro* with the rose extract treatment. More studies are needed to further study these effects and potential.

#### Resumo

Pretendemos avaliar o papel do extrato da rosa vermelha (Pierre de Ronsard) na expressão genética de CD20, CD30, CD40 e CCR5 em linfócitos B humanos. O extrato foi preparado na diluição de 0,0075% (v/v) e armazenado a -20°C até à sua utilização. O tratamento celular foi efectuado a 37°C. As células foram colocadas em placas de 6 poços a 1,5x10<sup>6</sup> células por poço e armazenadas a -80°C, extraíndo o ARN total. A RTq-PCR foi efectuada de acordo com a Genecopoeia. Utilizámos o método do limiar do ciclo ( $\Delta\Delta Ct$ ) para a análise dos dados. A quantificação comparativa do método Ct ( $2^{-\Delta Ct}$ ) e a alteração fold para CD20, CD30, CD40 e CCR5 foram - 5,65E+01, 4,80E-01, N/A, 2,47E-01; e 0,954, 0,377, N/A e 0,577, respetivamente. A quantidade de ARN total extraída de cerca de 4,5x10<sup>6</sup> células foi baixa e não permitiu medir o perfil de ARN. Com excepção do CD 40, todos os outros genes foram expressos e bem medidos em ambas as amostras de células B por qRT-PCR. Em conclusão, o tratamento com extrato de rosa diminuiu a expressão dos genes CD30 e CCR5 nos linfócitos B. São necessários mais estudos para aprofundar estes efeitos e o seu potencial.

## Introduction

B lymphocytes are known for their pivotal role in modulating immunity. They play a significant role in both innate and adaptive immunity which might be modified by these cells (1-4). Autoimmune disorders are modulated by B cells (2). B cells have a role in antibody synthesis, antigen presentation, cytokine, and chemokine synthesis (3). Cross-reactive antibodies synthesised by B cells help to regulate B cell memory and other immune-modulatory functions (4). The idiotype 9G4 (9G4+) antibody produced in B cells' function as an interface between innate and adaptive immunity (1). B cell depletion therapies have been used for the treatment of autoimmune disorders where CD20, CD30, CD 40, and CCR5 ligands are expressed on the surface of the B cells (5). These ligands are plasma membrane phosphoproteins and have deeper connections in the cells while their expression is modified in various diseases and conditions based on the cell and extracellular signals. CD 20 is expressed in a wide range of tumours and autoimmune disorder regulation (6-9). CD30 expression is found on Hodgkin and Reed-Sternberg cells, anaplastic large-cell lymphoma cells, and activated B or T lymphocytes. CD30 has been shown to be a transmembrane receptor that is significantly homologous to the tumour necrosis factor receptor (TNFR) family (10-11). CD40 is expressed primarily by activated T cells, as well as activated B cells and platelets, and is also induced on monocytic cells, natural killer cells, mast cells, and basophils under inflammatory conditions (12-15). The CCRF motif is multifunctional and plays a role in immune regulation and neointimal proliferation (16-17).

There are currently many drugs which modulate the effect of these ligands in various diseases, however, these medications are also associated with various side effects which would limit their use (18-25). The CD 20, CD 30, CD 40 and CCR5 are major transmembrane ligands associated with some important diseases. In previous studies, we observed the immunomodulatory effects of treatment with rose extract by the reduction of cytokines in endothelial cells (26) and the increase of certain cytokines by the T cells (27), as well as the increase in soluble CCR5 and prevention of hypoxic reduction of soluble CXCR4 of the endothelial cells (17). In this study, the rose extract was used to evaluate its impact on B cells. The regulation of these ligands on the B cell surface will provide more insights into the immune modulation of the rose extract.

## Introdução

Os linfócitos B são conhecidos pelo seu papel principal na modulação da imunidade. Desempenham um papel importante tanto na imunidade inata como na adaptativa que podem ser modificadas por estas células (1-4). As doenças auto-imunes são moduladas pelas células (2). As células B desempenham um papel na síntese de anticorpos, na apresentação de antígenos, na síntese de citocinas e de quimiocinas (3). Os anticorpos de reação cruzada sintetizados pelas células B ajudam a regular a memória das células B e outras funções imunomoduladoras (4). As células B produtoras de anticorpos do idiótipo 9G4 (9G4+) funcionam como interface entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (1). As terapias de depleção de células B têm sido utilizadas no tratamento de doenças auto-imunes (5). Os ligandos CD20, CD30, CD 40 e CCR5 são expressos na superfície das células B. Estes ligandos são fosfoproteínas da membrana plasmática e têm ligações mais profundas nas células, sendo a sua expressão alterada em várias doenças e condições através de sinais celulares e extracelulares. O CD 20 é expresso numa vasta gama de tumores e na regulação de doenças auto-imunes (6-9). A expressão de CD30 encontra-se nas células de Hodgkin e Reed-Sternberg, nas células do linfoma anaplásico de grandes células e nos linfócitos B ou T ativados. Foi demonstrado que o CD30 é um recetor transmembranar significativamente homólogo à família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR)(11,12). O CD40 é expresso principalmente por células T activadas, bem como por células B activadas e plaquetas; em condições inflamatórias, é também induzido em células monocíticas, células *natural killers*, mastócitos e basófilos (12-15). O motivo CCRF é multifuncional e intervém na regulação imunitária e na proliferação neointimal (16-17).

Atualmente, existem muitos medicamentos que modulam o efeito destes ligandos em várias doenças (18-25). No entanto, estes medicamentos estão também associados a vários efeitos secundários, o que limita a sua utilização (18-25). Os CD 20, CD 30, CD 40 e CCR5 são os principais ligandos transmembranares associados a algumas doenças importantes. Em estudos anteriores, observámos efeitos imunomoduladores do extrato de rosa através da redução de citocinas pelas células endoteliais (26) aumento de algumas citocinas pelas células T (27) e aumento do CCR5 solúvel e prevenção da redução hipóxica do CXCR4 solúvel das células endoteliais após o tratamento (17). Neste estudo, o extrato de

rosa foi utilizado para a avaliação do seu impacto nas células B. A regulação destes ligandos na superfície das células B deverá fornecer mais informações sobre a modulação imunitária do extrato de rosa.

## Methods

The preparation of the rose extract was previously described (26). The prepared extract was stored at -20 °C prior to use. The Rosa Rosaceae (Pierre de Ronsard) flower was chosen from the garden of the Tebu Bio Institute in Le Perray en Yvelines (France). In our previous study, we have shown that the rose extract at concentrations of 0.5% or lower is not associated with cell lysis (26).

Six vials of B cells, obtained from human peripheral mononuclear cells (PBMC) using positive immunomagnetic selection directly against CD19 and cryopreserved immediately after isolation, were thawed, pooled, and plated in each well of a 6-well plate at  $1.5 \times 10^6$  cells per well. After 24 h, the cells of three wells were treated for 24 h with 0.0075% (v/v) rose extract prepared during the project POMC-032018. In the remaining three wells, the B cells were untreated. After 24 h incubation, the treated and untreated cells were collected and washed with PBS twice. They were then centrifuged and stored at -80°C as cell pellets until RNA extraction. We chose 0.075% (v/v) as a safe and effective concentration for testing on the B cells in this study, since in our previous study the cytotoxic concentration on the endothelial cells was 0.5% or above and the effects of the rose extract treatment were detected to a concentration of 0.001%.

The materials used in the study were human peripheral blood B cells (CellApplications, ref. 6904-20a, lot 3342), blood cell growth medium kit (Cell Applications, ref. 615K-250), NucleoSpin RNA plus kit (Macherey-Nagel, ref. 740984.10) and BlazeTaq One-Step SYBR Green RT-qPCR Kit (Genecopoeia, ref. QP081). All-in-One™ qPCR human Primer from Genecopoeia for HPRT1, NM\_000194.2 (Ref. HQP009026), UBE2D2, NM\_181838.1 (Ref. HQP018366), CD20/MS4A1, NM\_152867.2 (Ref. HQP118276), CD30/TNFRSF8, NM\_001281430.2 (Ref. HQP059085), CD40/TNFRSF5, NM\_001322422.1 (Ref. HQP116918), CCR5, NM\_000579.3 (Ref. HQP002210) were also used in the study.

## Métodos

A preparação do extrato de rosa é descrita no nosso primeiro estudo (26). Posteriormente, o extrato foi armazenado a uma temperatura de -20 °C para nossa utilização. A flor Rosa Rosaceae (Pierre de Ronsard) foi escolhida no jardim do instituto Tebu Bio em Le Perray en Yvelines. Em estudo anterior, mostrámos que o extrato de rosa em concentrações iguais ou inferiores a 0,5% não está associado à lise celular (26).

Seis frascos de células B de células mononucleares periféricas humanas (PBMC) utilizando a seleção imunomagnética positiva diretamente contra CD19 e imediatamente criopreservadas após o isolamento, foram descongeladas, agrupadas e colocadas em 6 poços de uma placa de 6 poços a  $1,5 \times 10^6$  células por poço. Após 24 horas, as células de 3 poços foram tratadas durante 24 horas com 0,0075% (v/v) de extrato de rosa preparado durante o projeto POMC-032018. Nos outros três poços, as células B não foram tratadas. Após 24 horas de incubação, as células foram recolhidas como células tratadas e não tratadas, e lavadas duas vezes com PBS. Por fim, foram centrifugadas e armazenadas a -80°C como *pellets* de células até à extração de ARN. Uma vez que, no estudo anterior a concentração citotóxica nas células endoteliais foi de 0,5% ou superior e os efeitos do tratamento com extrato de rosa foram observados até uma concentração de 0,001%, escolhemos uma concentração de 0,075% (v/v) como uma concentração segura e eficaz para testar as células B neste estudo.

Os materiais utilizados e as referências são - células B do sangue periférico humano (CellApplications, ref. 6904-20a, lote 3342), kit de meio de crescimento de células sanguíneas (Cell Applications, ref. 615K-250), kit NucleoSpin RNA plus (Macherey-Nagel, ref. 740984.10) e BlazeTaq One-Step SYBR Green RT-qPCR Kit (Genecopoeia, ref. QP081). All-in-One™ qPCR human Primer da Genecopoeia para HPRT1, NM\_000194.2 (Ref. HQP009026), UBE2D2, NM\_181838.1 (Ref. HQP018366), CD20/MS4A1, NM\_152867.2 (Ref. HQP118276), CD30/TNFRSF8, NM\_001281430.2 (Ref. HQP059085), CD40/TNFRSF5, NM\_001322422.1 (Ref. HQP116918), CCR5, NM\_000579.3 (Ref. HQP002210) foram os outros materiais utilizados no estudo.

**Table 1** - Description of qRT-PCR reaction mix**Tabela 1** - Descrição da mistura de reação qRT-PCR

Component / Componente	Volume for test / Volume para teste	Volume for no RTase control / Volume para o controlo sem Rtase	Volume for no RNA template control / Volume para o controlo sem RNA template
BlazeTaq RTase Mix (50×) / Mistura de BlazeTaq RTase (50×)	0.4		0.4
PCR primer mix (2 μM) / Mistura de iniciadores PCR (2 μM)	2	2	2
RNA template (6 ng/reaction) / Modelo de ARN (6 ng/reação)	5	5	0
dd H <sub>2</sub> O / dd H <sub>2</sub> O	8.6	9	13.6
Total Volume / Volume total	20	20	20

**Table 2** - Details of qRT-PCR program.**Tabela 2** - Descrição da programa qRT-PCR

Cycles / Ciclos	Step / Passo	Temperature / Temperatura	Time / Tempo
1	Reverse Transcription / Tran- scrição inversa	42°C	10 min
1	Initial Denaturation / Des- naturação inicial	95°C	3 min
40	Denaturation / Desnatu- ração	95°C	10 s
	Extension / Extensão	60°C	30 s
Melting curve / Curva de fusão			

Total RNA was extracted using NucleoSpin RNA plus kit (Macherey-Nagel, ref. 740984.10) according to the manufacturer's protocol, including the DNase treatment. Extracted RNA was stored at -80°C for qRT-PCR assay. The qRT-PCR was conducted according to the Genecopoeia's instructions. The BlazeTaq™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR kit is designed to perform RT and real-time PCR in one step. The qRT-PCR was performed using 6 ng of total RNA. Two controls were made per sample, without RTase and without RNA template (NTC). The required volumes for qRT-PCR are presented in Table 1. The components mix was distributed in a PCR plate. Primer mix and RNA template were added to corresponding wells. PCR was performed using Eppendorf Mastercycler RealPlex 2S by following the PCR program presented in Table 2.

O ARN total foi extraído utilizando o kit NucleoSpin RNA plus (Macherey-Nagel, ref. 740984.10) de acordo com o protocolo do fabricante, incluindo o tratamento com DNase. O ARN extraído foi armazenado a -80°C para o ensaio de qRT-PCR. A qRT-PCR foi efectuada de acordo com as instruções da Genecopoeia. O kit BlazeTaq™ One-Step SYBR® Green RT-qPCR foi concebido para realizar RT e PCR em tempo real num único passo. A qRT-PCR foi efectuada utilizando 6ng de ARN total. Foram efectuados dois controlos por amostra, sem RTase e sem modelo de ARN (NTC). Os volumes necessários para a qRT-PCR são apresentados na Tabela 1. Os componentes da mistura foram distribuídos na placa de PCR. A mistura de *primers* e o modelo de ARN foram adicionados aos poços correspondentes. A PCR foi efectuada utilizando o Eppendorf Mastercycler RealPlex 2S, seguindo o programa de PCR apresentado na Tabela 2.

**Table 3 - Absorbance of extracted RNAs**  
**Tabela 3 - Absorvância dos ARN extraídos**

Sample / Amostra	Concentration / Concentração (ng/μl)	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$ ratio $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ rácio	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$ ratio $\frac{A_{260}}{A_{230}}$ rácio	RNA Integrity Number (RIN) / Número de integridade do ARN (NIA)
Untreated cells / Células não tratadas	16.4	1.855	0.759	N/A
Treated cells / Células tratadas	6.7	1.898	0.226	N/A

We evaluated the delta Ct ( $\Delta Ct$ ) value for each sample by subtracting the Ct value of the reference gene from the Ct value of the target gene. This gives the difference in gene expression levels between the target gene and reference gene in each sample. The mean delta Ct value was calculated for each group with or without treatment with rose extract. The delta-delta Ct method, also known as the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, is a simple formula used in order to calculate the relative fold gene expression of samples when performing real-time polymerase chain reaction or qPCR.

The  $\Delta\Delta Ct$  (cycle threshold) method was used for data analysis. In separate reactions, the Ct value was determined for each replicate of the housekeeping gene HPRT1 and UBE2D2 (HKG) and gene of interest (GOI) in both samples. For each sample, the difference between the Ct average of GOI replicate and the Ct average for the HKG was calculated ( $\Delta Ct$ ). The normalized GOI gene expression was then determined as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Absorbance spectra values were measured using a NanoVue™ spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

## Results

The amount of total RNA extracted from about  $4.5 \times 10^6$  cells was low and did not allow us to measure the RNA profile (Table 3). The A260/A230 ratios were very low, indicating a relatively high proportion of salts in the samples, however, this was due to the very low amount of RNA rather than an unexpected quantity of salts after extraction.

The fold-change is the normalized gene expression in the treated sample divided the normalized gene expression in untreated cells. Raw data are listed in Table 4 and the normalized gene expressions and fold changes are shown in Table 5.

Avaliámos o valor delta Ct ( $\Delta Ct$ ) para cada amostra subtraindo o valor Ct do gene de referência do valor Ct do gene alvo. Isto dá-lhe a diferença nos níveis de expressão genética entre o gene alvo e o gene de referência em cada amostra. O valor delta Ct médio foi calculado para cada grupo com ou sem tratamento com extrato de rosa. O método delta-delta Ct, também conhecido como o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , é uma fórmula simples utilizada para calcular a expressão genética relativa (fold) das amostras quando se realiza a reação em cadeia da polimerase em tempo real ou qPCR.

Para a análise dos dados, foi utilizado o método  $\Delta\Delta Ct$  (limiar do ciclo). Em reacções separadas, o valor Ct foi determinado para cada réplica do gene housekeeping HPRT1 e UBE2D2 (HKG) e do gene de interesse (GOI) em ambas as amostras. Para cada amostra, foi calculada a diferença entre a média de Ct da réplica do GOI e a média de Ct para o HKG ( $\Delta Ct$ ). A expressão normalizada do gene GOI foi então determinada como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Os valores do espectro de absorvância foram obtidos pelo NanoVue™ spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA).

## Resultados

A quantidade de ARN total extraído de cerca de  $4,5 \times 10^6$  células foi baixa e não nos permitiu medir o perfil de ARN (Tabela 3). Os rácios A260/A230 eram muito baixos, indicando uma proporção relativamente elevada de sais nas amostras, mas a razão foi a quantidade muito baixa de ARN e não uma quantidade inesperada de sais após a extração.

A alteração fold é a expressão genética normalizada na amostra tratada dividida pela expressão genética normalizada nas células não tratadas. Os dados brutos são apresentados na Tabela 4 e as expressões genéticas normalizadas e as alterações fold são apresentadas na Tabela 5.



**Table 4 - Ct values from the qRT-PCR**  
**Tabela 4 - Valores Ct da qRT-PCR**

		Test / Teste		no Rtase / sem Rtase		NTC
		Untreated / Não tratado	Treated / Tratados	Untreated / Não tratado	Treated / Tratados	
HPRT1	Triplicate / Triplicado 1	26.92	27.38	-	-	-
	Triplicate / Triplicado 2	27.03	27.53	-	-	-
	Triplicate / Triplicado 3	26.67	27.5	-	-	-
	Average / Média	26.87	27.47	-	-	-
UBE2D2	Triplicate / Triplicado 1	28.68	29.2	-	-	-
	Triplicate / Triplicado 2	28.54	28.91	-	39.79	-
	Triplicate / Triplicado 3	28.67	29.03	-	36.84	-
	Average / Média	28.63	29.04	-	38.31	-
CD20	Triplicate / Triplicado 1	21.94	22.43	37.24	38.45	33.27
	Triplicate / Triplicado 2	22.06	22.79	37.72	37.98	32.86
	Triplicate / Triplicado 3	21.8	22.3	36.96	35.96	33.09
	Average / Média	21.93	22.51	37.3	37.46	33.07
CD30	Triplicate / Triplicado 1	29.36	30.87	-	-	34.37
	Triplicate / Triplicado 2	28.35	30.69	-	-	36.71
	Triplicate / Triplicado 3	28.7	30.6	38.04	-	33.64
	Average / Média	28.81	30.72	-	-	34.91
CD40	Triplicate / Triplicado 1	34.7	40.81	-	-	36.48
	Triplicate / Triplicado 2	36.74	35.67	34.95	-	35.27
	Triplicate / Triplicado 3	34.13	35.97	34.14	36.51	35
	Average / Média	35.19	37.48	34.55	-	35.58
CCR5	Triplicate / Triplicado 1	29.75	31.6	-	-	34.85
	Triplicate / Triplicado 2	29.69	30.82	-	-	37.76
	Triplicate / Triplicado 3	29.86	30.78	-	39.13	35.67
	Average / Média	29.77	31.07	-	-	36.09

**Table 5 - Gene expression fold change between treated and untreated B cells**  
**Tabela 5 - Alteração da expressão genética entre células B tratadas e não tratadas**

	Average $\Delta Ct$ [Ct(GOI) - avg Ct (HKG)] $\Delta Ct$ Médio [Ct(GOI) - Ct médio (HKG)]		$2^{\Delta-\Delta Ct}$		Fold change / Variação de dobra	
	Não tratado	Tratada	Untreated / Não tratado	Treated / Tratada	Average / Média	Range / Alcance
CD20	-5.82	-5.75	5.65E+1	5.36E+1	0.954	0.509-1.79
CD30	1.06	2.47	4.80E-1	1.81E-1	0.377	0.205-0.695*
CD40	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CCR5	2.02	2.82	2.47E-1	1.42E-1	0.577	0.291-1.14

The analysis of gene expression by qRT-PCR showed that CD40 was not expressed in untreated cells and cells treated with rose extract with the Ct values over 32 (Table 5). The CD20 levels were not significantly altered by the rose extract treatment in this study. All other genes were expressed and were well measured in both B cell treated and untreated cell samples. The CT values of CD20 genes before and after rose extract treatment were -5.82 and -5.75, respectively, and the average fold change was 0.95 (0.51-1.79), which was not significant.

In this study, the expression of CD30 on the B cells was reduced after treatment with rose extract (0.0075%). It was reduced to a 0.377-fold change compared to untreated cells, and the results were consistent (0.205 to 0.695). The expression of CCR5 was also reduced by a -0.577-fold change, but the reduction was inconsistent as it crossed the non-specific mark (0.29 to 1.14).

## Discussion

This study suggests that treatment with rose extract results in a reduction in expression of CD30 in B lymphocytes and a tendency to reduce CCR5 gene expression. There were no changes in the expression of the CD20 gene after rose extract treatment, and CD40 was not expressed in treated or untreated B cells.

A clinical benefit would be the reduction of CD30 expression in cancerous cells. CD30 is an active marker in major tumours such as Hodgkins lymphoma, anaplastic large cell lymphoma, peripheral T cell lymphoma, and adult T cell lymphoma/leukemia, as well as in non lymphomatous malignancies (28,29). It also plays a role in angiogenic cancers such as angiosarcomas, epithelioid haemangioendothelioma, or Kaposi's sarcoma (30). CD30 inhibition is also associated with the treatment of primary effusion lymphoma (31). CD30 is also an active marker in autoimmune disorders but its role in this treatment is not clearly established. Targeting CD 30-30L has been used in the treatment of autoimmune and inflammatory disorders (32). Remission of rheumatoid arthritis has been observed in the treatment with brentuximab vedotin, and anti-CD30 agent (33). Inhibition of CD30 in T cells is also associated with reduced graft vs host disease (34) and immune

A análise da expressão genética por qRT-PCR mostrou que o CD40 não foi expresso em células não tratadas e em células tratadas com extrato de rosa com valores de Ct superiores a 32 (Tabela 5). Neste estudo os níveis de CD20 não foram significativamente alterados pelo tratamento com extrato de rosa. Todos os outros genes foram expressos e bem medidos tanto nas amostras de células B tratadas como nas não tratadas. Os valores de CT dos genes CD20 antes e depois do tratamento com extrato de rosa foram de -5,82 e -5,75, respetivamente, e a alteração média de fold foi de 0,95 (0,51-1,79) (não significativo).

Neste estudo, a expressão de CD30 nas células B é reduzida após o tratamento com extrato de rosa (0,0075%). Reduz para 0,377 vezes em comparação com as células não tratadas, e os resultados são consistentes (0,205 a 0,695). A expressão de CCR5 também é reduzida numa alteração de -0,577 vezes, mas a redução é inconsistente, uma vez que ultrapassa a marca não específica (0,29 a 1,14).

## Discussão

Este estudo sugere uma redução da expressão de CD30 após o tratamento com extrato de rosa nos linfócitos B e uma tendência para a redução da expressão do gene CCR5 após o tratamento com extrato de rosa nas células B. Não se verificaram alterações na expressão do gene CD20 após o tratamento com extrato de rosa e o CD40 não foi expresso em células B tratadas ou não tratadas.

Em termos clínicos um benefício interessante seria a redução da expressão de CD30 nas células cancerosas. O CD30 é um marcador ativo em tumores importantes, como o linfoma de Hodgkins, o linfoma anaplásico de grandes células, o linfoma periférico de células T e o linfoma/leucemia de células T do adulto, bem como em tumores malignos não linfomatosos (28,29). Desempenha igualmente um papel em tumores angiogénicos como os angiossarcomas, o hemangioendotelioma epitelióide, ou o sarcoma de Kaposi (30). Além disso, a inibição do CD30 está associada ao tratamento do linfoma de efusão primária (31). O CD30 é também um marcador ativo em doenças auto-imunes, mas o seu papel neste tratamento não é suficientemente conhecido. O tratamento com CD 30-30L tem sido utilizado no tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias<sup>32</sup>. A remissão da artrite reumatóide foi observada no tratamento com o agente anti-CD30, brentuximab vedotin (33). A inibição do CD30 nas células T está também associada à redução da rejeição de enxerto

complex-mediated glomerulonephritis (35). CD30-30L interaction inhibition has been experimentally associated with reduced atherosclerosis (36). Soluble CD30 is reduced in cases with stable coronary artery disease (37). CD30 expression is increased in patients with chronic obstructive pulmonary disease and in vascular remodelling (38).

Similarly, the efficacy of the rose extract in acquired immunodeficiency disorder treatment by the reduction in CCR5 on the T cell surface needs to be studied in retrovirus-infected cells. In our previous study, we have shown the effects in the reduction of soluble CCR5 in endothelial cells treated with rose extract (17). CCR5 has been shown to have a role in the regulation of vascular, neurological, and signalling in autoimmune disorders (39), as well as being involved in learning, memory, and cognitive functions (40).

Rose extract has been known for its anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic, and antidepressant effects (41, 42) also including a certain antibacterial activity (41-43). In previous studies we also have detected some anti-inflammatory effects of rose extract on T cells. The present study shows that the beneficial effects might be related to some extent with a reduction in CD30 levels, and CCR5 levels on the B cell surface.

Some limitations should be considered in this study. It was done *in vitro*, and certainly wider sample size dimensions are required for a full *in vitro* as *in vivo* concept evaluation. This study was very focused in certain cell ligands at the cell surface. Further evaluation is required with the detailed study on cytokines for more information on the B cell function after 0.0075% rose extract treatment. Finally, the active molecules involved in observed effects of the red rose extract need to be studied in detail by phytochemical analysis.

## Conclusions

The treatment of B lymphocytes with rose extract at 0.0075% (v/v) did not modify the expression of CD20. However, the expression of CD30 and CCR5 seemed to be decreased by the treatment. The range of the fold change showed that the result of CD30 expression was more accurate than for CCR5. The reduction of CD30 and CCR5 expression has potential for clinical applications which need to be studied in detail in *in vitro* and *in vivo* pathological models.

(34) e à glomerulonefrite imunomediada (35). Um estudo experimental associou a inibição da interação CD30-30L com a redução da aterosclerose (36). O CD30 solúvel está reduzido em casos com doença arterial coronária estável (37). A expressão de CD30 está aumentada em doentes com doença pulmonar obstrutiva crónica e na remodelação vascular (38).

A eficácia do extrato de rosa no tratamento da doença da imunodeficiência adquirida através da redução do CCR5 na superfície das células T deve ser estudada em células infectadas com retrovírus. Em estudo anterior, mostrámos os efeitos na redução do CCR5 solúvel em células endoteliais tratadas com extrato de rosa (17). O CCR5 também foi implicado na regulação da sinalização de doenças vasculares, neurológicas e auto-imunes (39) estando envolvido na aprendizagem, na memória e nas funções cognitivas (40).

O extrato de rosa é conhecido pelos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antidiabéticos e antidepressivos (41,42) atribuindo-se também tem uma certa atividade antibacteriana (41-43) . Em estudos anteriores também detectámos efeitos anti-inflamatórios do extrato de rosa em células T. O presente estudo mostra que até um certo ponto, os efeitos benéficos se devem a uma redução nos níveis de CD30 e CCR5 na superfície das células B.

Reconhecemos algumas limitações no nosso estudo. Foi efectuado *in vitro*, sendo certo serem necessários estudos de maior dimensão que envolvam um maior número de amostras para avaliar o conceito em *in vitro* e *in vivo*. O estudo centrou-se muito nos ligandos específicos da superfície celular. É necessária uma avaliação mais aprofundada das citocinas para obter mais informações sobre a função das células B após o tratamento com extrato de rosa a 0,0075%. As moléculas activas envolvidas no extrato de rosa vermelha devem ser estudadas em pormenor através de análises fitoquímica.

## Conclusões

O tratamento com extrato de rosa a 0,0075% (v/v) em linfócitos B não modificou a expressão de CD20. No entanto, a expressão de CD30 e CCR5 parece ter diminuído com o tratamento. O intervalo da alteração do fold mostrou que o resultado da expressão de CD30 era mais exato do que o de CCR5. A redução da expressão de CD30 e CCR5 parece ter potencial para aplicações clínicas que merecem ser estudadas em pormenor em modelos patológicos *in vitro* e *in-vivo*.



## **Funding**

None

## **Financiamento**

Nenhum

## **Authors Contributions Statement**

MCA conceived the idea and method, designed the study, interpreted results and wrote the paper. EM prepared the methods protocol, performed the experiments and derived the results.

## **Declaração sobre as contribuições dos autores**

MCA concebeu a ideia e o método, planeou o estudo, interpretou os resultados e escreveu o artigo. EM preparou o protocolo de métodos, realizou as experimentações e obteve os resultados.

## **Conflict of Interests**

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interests.

## **Conflito de Interesses**

Os autores declaram que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

## References / Referências

1. Milner, E. C., Anolik, J., Cappione, A., & Sanz, I. (2005). Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity?. *Springer seminars in immunopathology*, 26(4), 433–452. <https://doi.org/10.1007/s00281-004-0188-9>
2. Tsay, G. J., & Zouali, M. (2018). The Interplay Between Innate-Like B Cells and Other Cell Types in Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 9, 1064. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01064>
3. Zhang X. (2013). Regulatory functions of innate-like B cells. *Cellular & molecular immunology*, 10(2), 113–121. <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.63>
4. Grasseau, A., Boudigou, M., Le Pottier, L., Chriti, N., Cornec, D., Pers, J. O., Renaudineau, Y., & Hillion, S. (2020). Innate B Cells: the Archetype of Protective Immune Cells. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 58(1), 92–106. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08748-7>
5. Lee, D. S. W., Rojas, O. L., & Gommerman, J. L. (2021). B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(3), 179–199. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00092-2>
6. Pavlasova, G., & Mraz, M. (2020). The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, 105(6), 1494–1506. <https://doi.org/10.3324/haematol>.
7. Kläsener, K., Jellusova, J., Andrieux, G., Salzer, U., Böhrer, C., Steiner, S. N., Albinus, J. B., Cavallari, M., Süß, B., Voll, R. E., Boerries, M., Wollscheid, B., & Reth, M. (2021). CD20 as a gatekeeper of the resting state of human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(7), e2021342118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021342118>
8. [CD30 \[Internet\]. Pathology Outlines - PathologyOutlines.com. Available from: https://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd30.html](https://www.pathologyoutlines.com/topic/cdmarkerscd30.html)
9. Michot, J. M., Buet-Elfassy, A., Annereau, M., Lazarovici, J., Danu, A., Sarkozy, C., Chahine, C., Bigenwald, C., Bosq, J., Rossignol, J., Romano-Martin, P., Baldini, C., Ghez, D., Dartigues, P., Massard, C., & Ribrag, V. (2021). Clinical significance of the loss of CD20 antigen on tumor cells in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 4(3), 710–718. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.109>
10. de Bruin, P. C., Gruss, H. J., van der Valk, P., Willemze, R., & Meijer, C. J. (1995). CD30 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue: biological aspects and clinical implications. *Leukemia*, 9(10), 1620–1627.
11. van der Weyden, C. A., Pileri, S. A., Feldman, A. L., Whisstock, J., & Prince, H. M. (2017). Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. *Blood cancer journal*, 7(9), e603. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.85>
12. Funakoshi, S., Longo, D. L., Beckwith, M., Conley, D. K., Tsarfaty, G., Tsarfaty, I., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Spriggs, M. K., & Murphy, W. J. (1994). Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood*, 83(10), 2787–2794.
13. Linderth, J., Ehinger, M., Jerkeman, M., Bendahl, P. O., Akerman, M., Berglund, M., Enblad, G., Erlanson, M., Roos, G., & Cavallin-Ståhl, E. (2007). CD40 expression identifies a prognostically favourable subgroup of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 48(9), 1774–1779. <https://doi.org/10.1080/10428190701494520>
14. Feng, Z., & Wang, J. (2021). Soluble CD40 ligand inhibits the growth of non-Hodgkin's lymphoma cells through the JNK signaling pathway. *Oncology letters*, 21(1), 56. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12318>
15. Karnell, J. L., Rieder, S. A., Ettinger, R., & Kolbeck, R. (2019). Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. *Advanced drug delivery reviews*, 141, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.005>
16. Oppermann M. (2004). Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cellular signalling*, 16(11), 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.04.007>
17. Arokiaraj, M., & Menesson, E. (2021). Effect of rose extract treatment on soluble CCR5 and CXCR4 secretion by the endothelial cells in vitro. *Biomedical Research and Therapy*, 8(5), 4333-4344. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v8i5.672>
18. Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., & George, A. J. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(4), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrd3003>
19. Du, F. H., Mills, E. A., & Mao-Draayer, Y. (2017). Next-generation anti-CD20 monoclonal antibodies in autoimmune disease treatment. *Auto-immunity highlights*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0100-y>
20. Payandeh, Z., Bahrami, A. A., Hoseinpoor, R., Mortazavi, Y., Rajabibazl, M., Rahimpour, A., Taromchi, A. H., & Khalil, S. (2019). The applications of anti-CD20 antibodies to treat various B cells disorders. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 109, 2415–2426. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.121>
21. van Vollenhoven, R. F., Emery, P., Bingham, C. O., 3rd, Keystone, E. C., Fleischmann, R. M., Furst, D. E., Tyson, N., Collinson, N., & Lehane, P. B. (2013). Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Annals of the rheumatic diseases*, 72(9), 1496–1502. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201956>
22. Yi, J. H., Kim, S. J., & Kim, W. S. (2017). Brentuximab vedotin: clinical updates and practical guidance. *Blood research*, 52(4), 243–253. <https://doi.org/10.5045/br.2017.52.4.243>
23. Wang, Y., Nowakowski, G. S., Wang, M. L., & Ansell, S. M. (2018). Advances in CD30- and PD-1-targeted therapies for classical Hodgkin lymphoma. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0601-9>
24. Ramos, C. A., Grover, N. S., Beaven, A. W., Lulla, P. D., Wu, M. F., Ivanova, A., Wang, T., Shea, T. C., Rooney, C. M., Dittus, C., Park, S. I., Gee, A. P., Eldridge, P. W., McKay, K. L., Mehta, B., Cheng, C. J., Buchanan, F. B., Grilley, B. J., Morrison, K., Brenner, M. K., ... Savoldo, B. (2020). Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(32), 3794–3804. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01342>
25. Muta, H., & Podack, E. R. (2013). CD30: from basic research to cancer therapy. *Immunologic research*, 57(1-3), 151–158. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8464-1>
26. Arokiaraj, M. C., & Menesson, E. (2020). Novel anti-inflammatory and immunomodulation effects of rose on the endothelium in normal and hypoxic invitro conditions. *Angiologia E Chirurgia Vascolare*, 15(4), 238–248. <https://doi.org/10.48750/acv.221>
27. Arokiaraj, M. C., & Menesson, E. (2022). Cytokine Response of CD4+ T-Lymphocytes with Red Rose (Rosa Rosaceae – Pierre de Ronsard) Extracts by in Vitro Evaluation. *Galician Medical Journal*, 29(1), E202215. <https://doi.org/10.21802/gmj.2022.1.5>
28. Nakashima, M., & Uchimarui, K. (2023). CD30 Expression and Its Functions during the Disease Progression of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10):8731. <https://doi.org/10.3390/ijms24108731>
29. Sharman, J.P., Goldschmidt, J. H., Burke, J. M., Hellerstedt, B. A., McIntyre, K. et al. (2012) CD30 expression in nonlymphomatous malignancies. *Journal of Clinical Oncology* 30:15\_suppl, 3069. DOI: 10.1200/jco.2012.30.15\_suppl.3069
30. Alimchandani, M., Wang, Z. F., & Miettinen, M. (2014). CD30 expression in malignant vascular tumors and its diagnostic and clinical implications: a study of 146 cases. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 22(5), 358–362. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000048>
31. Bhatt, S., Ashlock, B. M., Natkunam, Y., Sujoy, V., Chapman, J. R., Ramos, J. C., Mesri, E. A., & Lossos, I. S. (2013). CD30 targeting with brentuximab vedotin: a novel therapeutic approach to primary effusion lymphoma. *Blood*, 122(7), 1233–1242. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-481713>
32. Oflazoglu, E., Grewal, I. S., & Gerber, H. (2009). Targeting CD30/CD30L in oncology and autoimmune and inflammatory diseases. *Advances in experimental medicine and biology*, 647, 174–185. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-89520-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-0-387-89520-8_12)
33. Vachhani, P., Bose, N., Brodeur, J. P., Holkova, B., & Bose, P. (2014). Remission of rheumatoid arthritis on brentuximab vedotin. *Rheumatology (Oxford, England)*, 53(12), 2314–2315. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu374>
34. Chen, Y. B., McDonough, S., Hasserjian, R., Chen, H., Coughlin, E., Illiano, C., Park, I. S., Jagasia, M., Spitzer, T. R., Cutler, C. S., Soiffer, R. J., & Ritz, J. (2012). Expression of CD30 in patients with acute graft-versus-host disease. *Blood*, 120(3), 691–696. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415422>

35. Artinger, K., Kirsch, A. H., Mooslechner, A. A., Cooper, D. J., Aringer, I., Schuller, M., Schabhüttl, C., Klötzer, K. A., Schweighofer, K., Eller, P., Yagita, H., Illert, A. L., Rosenkranz, A. R., Lane, P. J., & Eller, K. (2021). Blockade of tumor necrosis factor superfamily members CD30 and OX40 abrogates disease activity in murine immune-mediated glomerulonephritis. *Kidney international*, 100(2), 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.02.039>
36. Foks, A. C., Bot, I., Frodermann, V., de Jager, S. C., Ter Borg, M., van Santbrink, P. J., Yagita, H., Kuiper, J., & van Puijvelde, G. H. (2012). Interference of the CD30-CD30L pathway reduces atherosclerosis development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(12), 2862–2868. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300509>
37. Mahmoudi, M. J., Hedayat, M., Rezaei, N., Saboor-Yaraghi, A. A., & Mahmoudi, M. (2011). In vitro soluble CD30 levels in patients with chronic stable coronary artery disease. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*, 10(4), 237–242.
38. Luo, L., Liu, Y., Chen, D., Chen, F., Lan, H. B., & Xie, C. (2018). CD30 Is Highly Expressed in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Induces the Pulmonary Vascular Remodeling. *BioMed research international*, 2018, 3261436. <https://doi.org/10.1155/2018/3261436>
39. Jones, K. L., Maguire, J. J., & Davenport, A. P. (2011). Chemokine receptor CCR5: from AIDS to atherosclerosis. *British journal of pharmacology*, 162(7), 1453–1469. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01147.x>
40. Necula, D., Riviere-Cazaux, C., Shen, Y., & Zhou, M. (2021). Insight into the roles of CCR5 in learning and memory in normal and disordered states. *Brain, behavior, and immunity*, 92, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.037>
41. Mahboubi M. (2015). Rosa damascena as holy ancient herb with novel applications. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.09.005>
42. Lee, M. H., Nam, T. G., Lee, I., Shin, E. J., Han, A. R., Lee, P., Lee, S. Y., & Lim, T. G. (2018). Skin anti-inflammatory activity of rose petal extract (*Rosa gallica*) through reduction of MAPK signaling pathway. *Food science & nutrition*, 6(8), 2560–2567. <https://doi.org/10.1002/fsn3.870>
43. Safdar Y., Malik T. (2020) Antibacterial activity of rose extract. *Open Access journal of complementary and alternative medicine*, 2(4), 194-201. DOI: 10.32474/OAJCAM.2020.02.000144