



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELANE CONCEIÇÃO DOS SANTOS

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
ALAGOAS EM MACRÓFAGOS MURINOS ATIVADOS POR
LIPOPOLISSACARÍDEO *IN VITRO***

MACEIÓ-AL

2022

ELANE CONCEIÇÃO DOS SANTOS

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA PRÓPOLIS VERMELHA DE
ALAGOAS EM MACRÓFAGOS MURINOS ATIVADOS POR
LIPOPOLISSACARÍDEO *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

MACEIÓ-AL

2022

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Elane Conceição dos.
Atividade imunomoduladora da própolis vermelha de Alagoas em macrófagos murinos ativados por lipopolissacarídeo *in vitro* / Elane Conceição dos Santos. – 2022.
80 f. : il. color.

Orientador: Ênio José Bassi.
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 65-76.
Anexos: f. 77-80.

1. Própole. 2. Macrófagos. 3. Imunomodulação. 4. Isoliquiritigenina. 5. Formononetina. I. Título.

CDU: 615.1:638.135



Ata de defesa de dissertação

Aos **dezessete dias** do **mês de março de 2022**, às oito horas e trinta minutos, reuniu-se, via videoconferência, a banca examinadora composta pelos docentes doutores, Ênio José Bassi, Ticiano Gomes do Nascimento e Tércio Teodoro Braga para o **exame de defesa** da dissertação intitulada: **ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS EM MACRÓFAGOS MURINOS ATIVADOS POR LIPOPOLISSACARÍDEO IN VITRO**", elaborada pela mestranda **Elane Conceição dos Santos**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação do **Prof. Dr. Ênio José Bassi**. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 10:09 horas, os examinadores consideram a dissertação **(X) APROVADA OU () APROVADA COM RESTRIÇÃO**, emitindo o seguinte parecer: a discente foi aprovada.

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 10:20 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela Banca Examinadora e pela Mestranda.

Maceió, 17 de março de 2022

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Ênio José Bassi

Documento assinado digitalmente
 Enio Jose Bassi
Data: 17/03/2022 10:34:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador Interno: Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento

Documento assinado digitalmente
 TICIANO GOMES DO NASCIMENTO
Data: 17/03/2022 12:12:13-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador Externo: Prof. Dr. Tércio Teodoro Braga

Documento assinado digitalmente
 TARCIO TEODORO BRAGA
Data: 17/03/2022 20:54:41-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Mestranda: Elane Conceição dos Santos

Documento assinado digitalmente
 ELANE CONCEICAO DOS SANTOS
Data: 17/03/2022 22:40:10-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, ao meu pai e ao meu irmão
que partiram desta vida e descansam nos
braços do Senhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por Ele ter me proporcionado este momento mais que especial em minha vida. Por Ele ter me dado forças para conseguir chegar até aqui.

Agradeço a Universidade Federal de Alagoas, a Capes e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), por terem contribuído para a minha formação.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ênio José Bassi e sua esposa Prof. Dra. Letícia Anderson Bassi, por terem dado a oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço também, pelo profissionalismo, ética e compromisso, que serviram de exemplo e pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Agradeço a todos os colegas e amigos de trabalho, Grazielle, Júlia, Kátia, Jamile, Stephannie, João e a Ana Rachel (técnica do laboratório) pelo companheirismo e contribuições que enriqueceram este trabalho.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe Antônia, aos meus entes queridos Pedro Luiz (Pai) e Elielson (Irmão) que partiram dessa vida e hoje descansam em paz.

Ao meu esposo Firmino, que sempre me apoiou e nos últimos meses têm sido o meu porto seguro.

A minha amiga Érica, que desde a graduação nossa amizade vem se fortalecendo.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEAL por todo apoio financeiro para que esse estudo fosse realizado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para que este trabalho fosse concretizado. A vocês meu muito obrigado!

RESUMO

A própolis vermelha (PV) é uma resina natural, produzida pelas abelhas *Apis mellifera* a partir do exsudato vegetal (*Dalbergia ecastophyllum*), que possui diversas propriedades biológicas, incluindo-se a atividade anti-inflamatória. A inflamação é um mecanismo de resposta do organismo contra várias lesões; entretanto, esse processo exacerbado pode desencadear uma doença inflamatória e dano tecidual. Assim, a busca por novos agentes imunomoduladores naturais é necessária para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que modulem o processo inflamatório. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial imunomodulador da própolis vermelha de Alagoas (PVA) e dos seus constituintes isoliquiritigenina (ISL) e formononetina (FMT) em macrófagos murinos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro*. Para isso, inicialmente, foi determinada a concentração máxima não tóxica (CMNT) do extrato hidroalcolólico (EH) da PVA, da ISL e da FMT em macrófagos murinos da linhagem J774A.1, a partir da análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Em seguida, as atividades imunomoduladoras do EH da PVA, ISL ou FMT foram avaliadas mediante o tratamento dos macrófagos estimulados com LPS sob diferentes condições experimentais. A expressão dos marcadores F4/80 e CD86 foi avaliada por citometria de fluxo multiparamétrica e a quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias foi avaliada pela metodologia de *Cytometric Bead Array* (CBA) no sobrenadante de cultivo celular. A ativação de MAPKs (do inglês “mitogen-activated protein kinases”) foi avaliada pela análise da fosforilação das proteínas ERK1/2 e p38 por citometria de fluxo intracelular. A expressão dos genes *NOS2*, *Arg1*, *SOCS3*, *TGF-β*, *Lamp2*, *MIP-1α*, *Ccne1* e HO-1 foi avaliada por RT-qPCR. Foi observado que o tratamento com o EH da PVA reduziu a porcentagem de células duplo positivas (F4/80+ CD86+), diminuiu a expressão da molécula de ativação CD86 e os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF. Além disso, um aumento na fosforilação de ERK1/2, p38 e diminuição da expressão de *NOS2* e *SOCS3* foram detectados 48h após o tratamento. O tratamento com ISL reduziu significativamente a frequência de células F4/80+ CD86+, diminuiu a expressão de CD86 e a fosforilação das proteínas ERK1/2 e p38. Os níveis de IL-6 e TNF também foram reduzidos após o tratamento com ISL. Ainda, verificou-se uma diminuição significativa da expressão dos genes *NOS2* e *SOCS3*. Por outro lado, o tratamento com a FMT não reduziu a porcentagem de células duplo-positivas (F4/80+ CD86+) e não alterou a fosforilação das vias ERK1/2 e p38 em macrófagos murinos estimulados com LPS. No entanto, foi observado a redução nos níveis de IL-6 e TNF no sobrenadante dos macrófagos tratados com a FMT. Em conclusão, neste estudo, verificou-se uma promissora atividade imunomoduladora da PVA e do composto ISL em macrófagos murinos *in vitro*. Esses resultados podem contribuir para um maior entendimento da atividade imunomoduladora do PVA e de seus constituintes, favorecendo o desenvolvimento de novas terapias e intervenções imunológicas para o tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: Própolis vermelha, macrófago, imunomodulação, isoliquiritigenina, formononetina.

ABSTRACT

Red propolis (RP) is a natural resin, produced by *Apis mellifera* bees from plant exudate (*Dalbergia ecastophyllum*), which has several biological properties, including anti-inflammatory activity. Inflammation is the body's response mechanism against various injuries; however, this exacerbated process can trigger an inflammatory disease. Thus, the search for new natural immunomodulatory agents is necessary for the development of new therapeutic approaches that modulate the inflammatory process. In this context, the objective of this work was to evaluate the immunomodulatory potential of Alagoas red propolis (ARP) and its constituents isoliquiritigenin (ISL) and formononetin (FMT) in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) *in vitro*. Initially, the maximum non-toxic concentration (CMNT) of the hydroalcoholic extract (HE) of PVA, ISL, and FMT in murine macrophages of the J774A.1 cell line was determined, based on the analysis of cell viability by the MTT assay. Then, the EH immunomodulatory activities of ARP, ISL, or FMT were evaluated by treating LPS-stimulated macrophages under different experimental conditions. The expression of markers F4/80 and CD86 was evaluated by multiparametric flow cytometry and the quantification of pro and anti-inflammatory cytokines was evaluated by the Cytometric Bead Array (CBA) methodology in the cell culture supernatant. Activation of MAPKs (mitogen-activated protein kinases) was evaluated by analyzing the phosphorylation of ERK1/2 and p38 proteins by intracellular flow cytometry. The expression of *NOS2*, *Arg1*, *SOCS3*, *TGF- β* , *Lamp2*, *MIP-1 α* , *Ccne1*, and *HO-1* genes was evaluated by RT-qPCR. It was observed that treatment with EH of PVA reduced the percentage of double-positive cells (F4/80+ CD86+), decreased the expression of the activating molecule CD86 and the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF. Furthermore, an increase in ERK1/2 and p38 phosphorylation and a decrease of *NOS2* and *SOCS3* expression were detected 48h after treatment. Treatment with ISL significantly reduced the frequency of F4/80+ CD86+ cells, decreased CD86 expression and phosphorylation of ERK1/2 and p38 proteins. IL-6 and TNF levels were also reduced after ISL treatment. Furthermore, there was a significant decrease in the expression of *NOS2* and *SOCS3* genes. On the other hand, FMT treatment did not reduce the percentage of double-positive cells (F4/80+ CD86+) and did not alter the phosphorylation of the ERK1/2 and p38 pathways in LPS-stimulated murine macrophages. However, a reduction in IL-6 and TNF levels was observed in the supernatant of macrophages treated with FMT. In conclusion, in this study, it was detected a promising immunomodulatory activity of ARP and the ISL compound on murine macrophages *in vitro*. These results contribute to a better understanding of the immunomodulatory activity of ARP and its constituents, favoring the development of new therapies and immunological interventions for the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: Red propolis, macrophage, immunomodulation, isoliquiritigenin, formononetin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inflamação aguda e inflamação crônica.	18
Figura 2. Microscopia eletrônica de macrófagos alveolares de camundongo.	19
Figura 3. Origem das linhagens de macrófagos embrionários e adultos.	21
Figura 4. Subtipos de monócitos no estado estável e na inflamação.	22
Figura 5. Ativação e polarização dos macrófagos M1 e M2.	26
Figura 6. Mecanismos e principais vias de polarização dos macrófagos M1 e M2.	27
Figura 7. O papel de macrófagos M1 e M2 na inflamação e reparo tecidual.	30
Figura 8. Origem botânica da própolis vermelha.	32
Figura 9. Compostos químicos encontrados na própolis vermelha de Alagoas.	33
Figura 10. Esquema do desenho experimental e análise microscópica.	40
Figura 11. Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 após tratamento com o extrato hidroalcolólico (EH) da própolis vermelha de Alagoas (PVA).	44
Figura 12. Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 após tratamento com os compostos isoliquiritigenina (ISL) ou formononetina (FMT).	45
Figura 13. Alterações morfológicas de células J774A.1 estimuladas com LPS e tratadas com o EH da PVA.	45
Figura 14. O efeito dos compostos ISL e FMT na morfologia celular.	46
Figura 15. Análise do tamanho e complexidade celular de macrófagos J774A.1 estimuladas com LPS após tratamento com EH da PVA.	47
Figura 16. O efeito da ISL e FMT no tamanho relativo dos macrófagos J774.1.	48
Figura 17. Expressão de marcadores F4/80 e CD86 em macrófagos J774A.1 ativados com LPS e tratados com o EH da PVA.	49
Figura 18. Análise da expressão de F4/80 e CD86 em macrófagos J774.A1 ativados com LPS e tratados com ISL.	50
Figura 19. Quantificação de citocinas no sobrenadante de macrófagos J774A.1 estimulados com LPS após o tratamento com EH da PVA.	52
Figura 20. Quantificação de citocinas no sobrenadante de macrófagos J774A.1 estimulados com LPS após o tratamento com EH da PVA, ISL e FMT.	53
Figura 21. Análise da fosforilação de ERK1/2 e p38 em macrófagos estimulados com LPS e tratados com EH da PVA, ISL ou FMT.	56
Figura 22. Expressão relativa dos genes envolvidos em diferentes processos biológicos nos macrófagos após o tratamento com o EH da PVA ou ISL.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores característicos dos macrófagos classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2).	23
Tabela 2. Componentes químicos identificados na própolis vermelha brasileira e suas respectivas atividades biológicas.....	34
Tabela 3. Primers utilizados para avaliar os efeitos do extrato da PVA e da ISL nos macrófagos.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Células Apresentadoras de Antígenos

Arg1: Arginase 1

ARG1: Arginase 1

CD86: Cluster of Differentiation 86

CD11b: Cluster of Differentiation 11b

CMNT: Concentração máxima não tóxica

CCL3: Ligante de quimiocina 3

c-Myb: Fator de transcrição

CX3CR1: Receptor 1 de quimiocina CX3C

CT: “Cycle threshold”

CCNE1: Ciclina E1

CCNE1: Cyclin E1 gene

CCL3: C-C Motif Chemokine Ligand 3 gene

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: Dulbecco’s Modified Eagle’s - Medium

EH: Extrato Hidroalcoólico

ERK1/2: Proteínas quinases reguladas por sinal extracelular

F4/80: Marcador para macrófagos murinos

FSC: “Forward scatter”

FMT: Formononetina

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos

GPx: Glutathione peroxidase

GR: Glutathione reductase

HO1: Heme oxygenase 1

HMOX1: Heme oxygenase 1

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

IL-1 α : Interleucina 1 α

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-4: Interleucina 4

IL-13: Interleucina 13

ILCs: Células linfoides inatas

iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzível

ISL: Isoliquiritigenina

IRFs: Fator regulador de interferon

IFN- γ : Interferon γ

Ly6C^{high}CD43⁻: Monócitos clássicos

Ly6C^{low}CD43⁺: Monócitos não clássicos

Lamp2: Proteína 2 de membrana associada ao lisossoma

LAMP2: Lysosomal Associated Membrane Protein 2 gene

LPS: Lipopolissacarídeo

M-CSF: Fator estimulante de colônia de macrófagos

M1: Macrófagos M1

M2: Macrófagos M2

MFI: Mediana de intensidade de Fluorescência

MAPKs: Proteína quinase ativada por mitógeno

MTT: Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

MMPs: Metaloproteinases

MHC-II: Complexo principal de histocompatibilidade

NO: Óxido nítrico

NOS2: Nitric Oxide Synthase 2 gene

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NK: Células Natural Killer

Nrf2: Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2

P1: Período perinatal

PAMP: Padrão molecular associado a patógeno

PRR: Receptores de reconhecimento padrão

PBS: Tampão Fosfato Salino

PV: Própolis vermelha

PVA: Própolis Vermelha de Alagoas

p38: Proteínas quinases ativadas por mitógenos

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SSC: “Side scatter”

SOCS3: Supressor de sinalização de citocinas 3

SOCS3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3 gene

TGFβ: Transforming Growth Factor Beta 1 gene

TCR: Receptor de células T

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Inflamação	17
2.2. Macrófagos	18
2.2.2. Ativação	24
2.2.3. O papel dos macrófagos na inflamação	28
2.2.3.1. Fagocitose	28
2.2.3.2. Apresentação de antígenos	29
2.2.3.3. Imunomodulação	29
2.3. Produtos naturais.....	30
2.4. Própolis vermelha	31
2.4.1. Composição química.....	32
2.4.2. Atividades biológicas da própolis vermelha	33
2.4.2.1. Atividade antimicrobiana e antifúngica.....	34
2.4.2.2. Atividade antitumoral	35
2.4.2.3. Atividade antioxidante.....	35
2.4.2.4. Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora	36
3. OBJETIVOS	36
3.1. Geral.....	36
3.2. Específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Cultivo celular.....	38
4.2. Extrato da própolis vermelha de Alagoas e compostos isolados	38
4.3. Viabilidade celular e Citotoxicidade do EH, ISL e FMT	38
4.4. Ativação e tratamento dos macrófagos com a própolis vermelha	39
4.5. Análise da expressão de F4/80 e CD86 por citometria de fluxo.....	40
4.6. Quantificação de citocinas no sobrenadante dos macrófagos.....	40
4.7. Análise da ativação das vias ERK1/2 e p38	41
4.8. Extração e quantificação de RNA para avaliação da expressão gênica.....	41
4.9. qRT-PCR	42
4.10. Análises estatísticas	43

5. RESULTADOS	44
5.1. Análise da citotoxicidade do EH da PVA, ISL e FMT em macrófagos J774A.1	44
5.2. Ativação e tratamento dos macrófagos com o EH, ISL ou FMT	45
5.3. Análise da expressão dos marcadores F4/80 e CD86 em macrófagos J774A.1 ..	48
5.4. Quantificação de citocinas no sobrenadante	51
5.6. Análise da ativação das vias de MAPKs	55
5.7. Modulação da expressão gênica em macrófagos J774A.1 após tratamento com o EH da PVA e ISL.....	56
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO	64
8. REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

Os macrófagos são células da imunidade inata e possuem um papel muito importante na inflamação e na resposta imune contra patógenos, além disso, desempenham um papel crucial no desenvolvimento e manutenção da homeostase (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017), e podem ser encontrados em vários tecidos desempenhando funções específicas (KOHYAMA et al., 2009; KREUTZBERG, 1996; TAN; KRASNOW, 2016; WEISBERG et al., 2003). Na embriogênese, estas células são originadas a partir do saco vitelino e do fígado fetal e se mantêm por autorrenovação (TAKAHASHI; YAMAMURA; NAITO, 1989). Na fase adulta, os monócitos derivados da medula óssea dão origem aos macrófagos (VAN FURTH; COHN, 1968), durante o processo inflamatório, monócitos circulantes são recrutados da corrente sanguínea para o sítio de inflamação, onde são diferenciados em macrófagos (YANG et al., 2014).

Estas células possuem diferentes perfis de ativação, destacando-se a ativação clássica (macrófagos M1) e a alternativa (macrófagos M2). Os macrófagos M1 possuem um perfil pró-inflamatório induzido por estímulos microbianos (lipopolissacarídeo (LPS)), e por citocinas e fatores de crescimento (IFN- γ , GM-CSF), é caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio estando envolvidos nas respostas antitumorais e antimicrobianas. Os macrófagos M2 possuem um perfil imunossupressor induzido por citocinas e fatores de crescimento (IL-4, IL-13, M-CSF), é caracterizado pela produção citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β p. ex.) e atuam no processo de reparo e cicatrização tecidual (SICA et al., 2008).

Os macrófagos atuam tanto no processo inflamatório, que é um mecanismo de defesa do organismo iniciado por vários fatores (físicos, químicos ou biológicos), que irá resultar numa resposta imune a fim de retornar a homeostase (MALYSHEV; et al., 2014). Neste cenário, os macrófagos tornam-se uma das principais células atuando nos processos infecciosos e homeostáticos eliminando os patógenos pela fagocitose, secretando citocinas pró- e anti-inflamatórias, atuando na angiogênese e remodelação tecidual (BISWAS; SICA; LEWIS, 2008).

Embora, no processo infeccioso, a inflamação seja um mecanismo de defesa do organismo em determinadas patologias a sua exacerbação pode causar lesões teciduais crônicas, como ocorre na artrite reumatoide, onde o processo inflamatório leva à destruição da cartilagem. Além disso, destacam-se outras doenças inflamatórias como doenças inflamatórias intestinais, cardiovasculares e metabólicas (BISWAS et al., 2012).

Assim, os macrófagos têm se tornado alvos no desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias em diversas doenças, levando a uma busca pela descoberta de novos agentes imunomoduladores que possam atuar nestas células.

Nesse contexto, os produtos naturais têm sido utilizados como fontes alternativas de pesquisa e descoberta de novos agentes moduladores do processo inflamatório (ALMEIDA; MENEZES, 2002; BISWAS et al., 2012; LIU et al., 2014; RUSCITTI et al., 2017). Dentre os diversos produtos naturais existentes, destaca-se a própolis vermelha (PV), um material resinoso, de cor vermelho intensa, originado a partir da coleta do exsudato de plantas *Dalbergia ecastophyllum* por abelhas *Apis mellifera* (SILVA et al., 2008), que possui diversas propriedades farmacológicas (RUFATTO et al., 2017).

A PV difere quimicamente das demais própolis devido ao alto teor de isoflavonoides encontrados em sua composição (SILVA et al., 2008). Por meio de análises fitoquímicas, utilizando métodos de cromatografia e espectrometria de massa, foi possível identificar na PV importantes moléculas bioativas, incluindo-se as isoflavonas homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol (ALENCAR et al., 2007). Diversas atividades biológicas foram descritas para isoflavonas, destacando-se antimicrobiana (INUI et al., 2014), antifúngica (BLOUNT; DIXON; PAIVA, 1992), anticancerígena (MILITÃO et al., 2006) e antioxidante (REIS et al., 2019). As atividades anti-inflamatória e imunomoduladora da PV também já foram mostradas em células do sistema imune como neutrófilos e macrófagos (BUENO-SILVA et al., 2016, 2017b). No entanto, os mecanismos de ação da PV envolvidos ainda são pouco elucidados. Assim, estudos para melhor esclarecer a atividade imunomoduladora e anti-inflamatória da PV tornam-se necessários, contribuindo para a descoberta e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas. Diante deste contexto, a hipótese deste trabalho é que a PV de Alagoas exerça uma atividade imunomoduladora e anti-inflamatória em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inflamação

A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo contra uma lesão tecidual causada por fatores infecciosos (bactérias, vírus e outros microrganismos), não infecciosos (físicos, químicos e biológicos) e por respostas autoimunes. Durante o processo inflamatório agudo, células do sistema imune são ativadas e recrutadas para o sítio da lesão ou da infecção, contribuindo para restauração da homeostase do tecido (Zanini, et. al.1994).

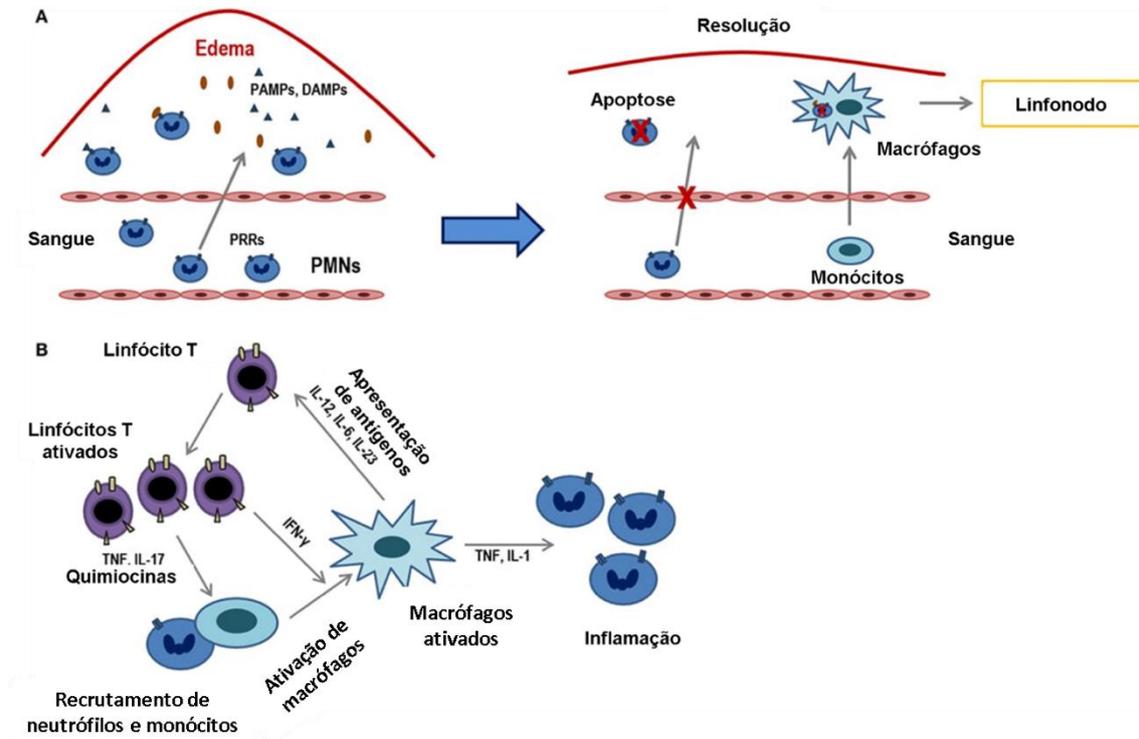
O processo inflamatório é caracterizado pela dor, calor, vermelhidão e inchaço, que são resultantes da resposta imunológica das células no tecido, seja por agentes infecciosos ou não infecciosos. Durante o processo inflamatório, ocorrem alterações da permeabilidade vascular, recrutamento e acúmulo de células do sistema imune (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos e células dendríticas) e liberação de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, p. ex.) (CHERTOV et al., 2000; JABBOUR et al., 2009). Esse processo é fundamental para a resposta imune. No entanto, em situações anormais, a inflamação pode resultar em dano tecidual levando a uma disfunção orgânica.

O processo inflamatório pode ser dividido em inflamação aguda e crônica (Figura 1). A inflamação aguda é geralmente de curta duração podendo levar poucas horas ou alguns dias para cessar e as suas principais características são a formação do edema, através da exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas, e a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. A inflamação crônica possui duração mais longa que a inflamação aguda, podendo perdurar por meses ou anos, e as principais características são a presença de infiltrado predominante de linfócitos e macrófagos, angiogênese, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Por fim, em determinadas situações a inflamação aguda e crônica precisa ser inibida através da imunossupressão de células efetoras e redução de mediadores inflamatórios, permitindo a reparação do dano e a cicatrização tecidual. A inibição da inflamação pode incluir a apoptose de células inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias e antioxidantes, e também a produção de inibidores que agem diretamente nas proteases. Neste processo, é importante ressaltar que os macrófagos tem um papel fundamental na regulação negativa

do processo inflamatório contribuindo ainda para a regeneração tecidual (GU; YANG; SHI, 2017; OISHI; MANABE, 2018).

Figura 1. Inflamação aguda e inflamação crônica.



Esquema do processo inflamatório. (A) Início da inflamação aguda e resolução. (B) Inflamação crônica. Fonte: Traduzido de (MORO-GARCÍA et al., 2018)

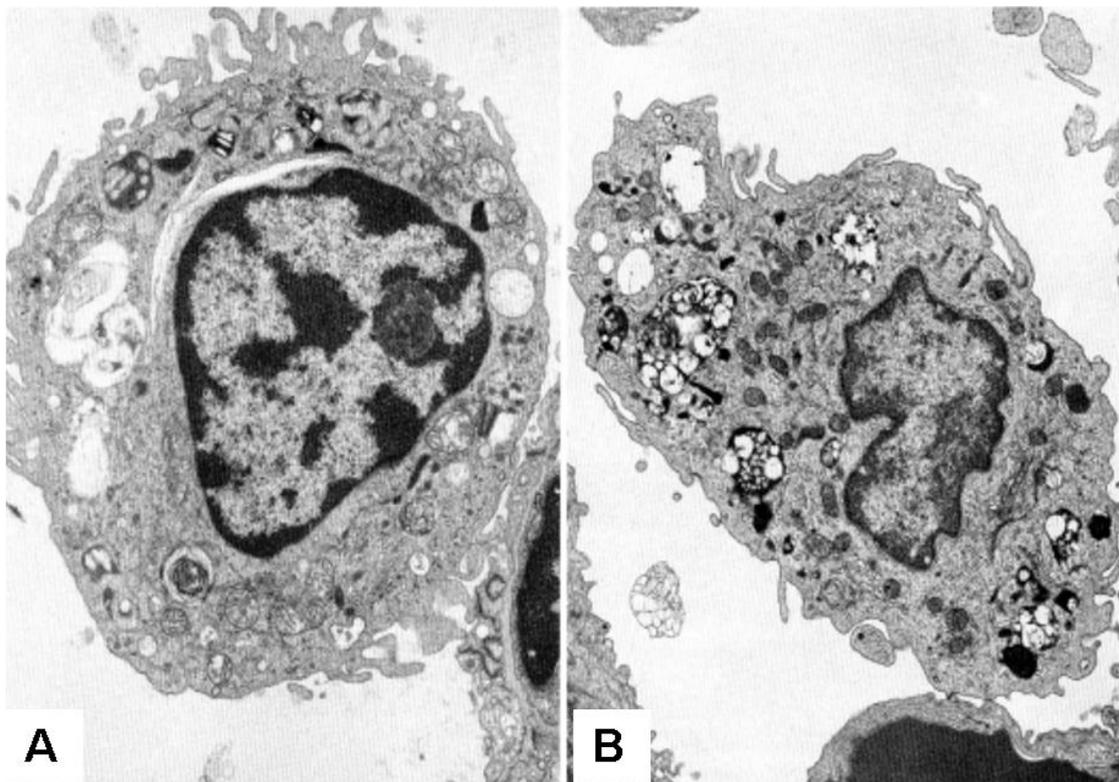
2.2. Macrófagos

Os macrófagos foram descobertos no final do século XIX, pelo pesquisador Metchnikoff, após observar que células móveis englobavam partículas estranhas, sendo essas células nomeadas de acordo com seu tamanho, dando os nomes de “micrófagos” e “macrófagos” às células menores e maiores respectivamente, e o processo de englobamento das partículas foi denominado fagocitose (METCHNIKOFF, 1989). Estas células foram então consideradas essenciais na resposta imune inata pois desempenham um papel importante na inflamação e defesa do organismo, após observarem que essas células ingeriam e digeriam corpos estranhos, células mortas e debris, e produziam mediadores químicos que recrutavam outros tipos celulares para o sítio da infecção (MURRAY; WYNN, 2011; TAUBER, 2003). Além do seu papel na imunidade, os macrófagos também estão envolvidos em importantes mecanismos tróficos durante o

desenvolvimento (POLLARD, 2009), manutenção da homeostase celular, desenvolvimento de tecidos, morfogênese e angiogênese (NEWMAN; HUGHES, 2012), e remodelação óssea (MARKS JR. et al., 1992).

Os macrófagos são encontrados como células residentes em tecidos e possuem uma grande heterogeneidade funcional e morfológica, dependendo dos tecidos nos quais estão inseridos. Em geral os macrófagos são células grandes, com contornos irregulares e possuem um aumento no seu conteúdo citoplasmático devido a vacuolização, resultante da formação de vesículas de pinocitose ou fagocitose. Essas células podem apresentar prolongamentos citoplasmáticos, denominados pseudópodes, conferindo-lhes maior motilidade e eficiência na captura de partículas estranhas (Figura 2A) (JESSEN; MOE, 1972). Além disso, a presença de lisossomos no interior dessas células (Figura 2B), que acumulam enzimas hidrolíticas (lipases, nucleases e glicosilases), estão envolvidos no processo de digestão de partículas decorrente do processo de fagocitose (COHN; HIRSCH, 1960).

Figura 2. Microscopia eletrônica de macrófagos alveolares de camundongo.



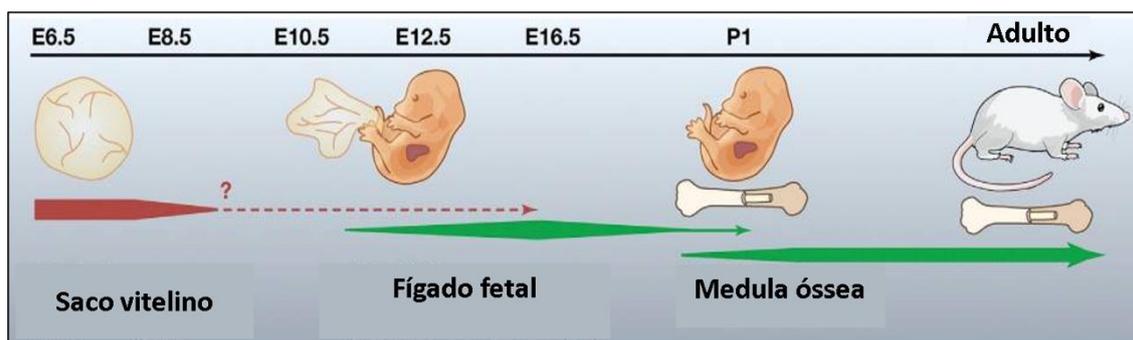
(A) Morfologia de macrófago alveolar imaturo em camundongo *op/op*, 8,000x. (B) Morfologia de macrófago alveolar maduro de um camundongo normal, mostrando organelas intracitoplasmáticas bem desenvolvidas, 6,000x. Fonte: (NAITO, 1993)

A priori, os macrófagos foram classificados como integrantes do sistema de fagócitos mononucleares (SFM) o qual refere-se a um grupo de células provenientes da linhagem hematopoiética derivadas da medula óssea e com alta capacidade fagocítica, incluindo assim os monócitos e os macrófagos (HUME, 2006; STRAUSS, 1979; VAN FURTH et al., 1972). No entanto, vários estudos demonstraram que essas células podem ser divididas em subpopulações de acordo com seu status fisiológico, incluindo os macrófagos de perfil M1 pró- inflamatório e os de perfil M2 anti-inflamatório (MILLS et al., 2000). Ainda dentro dessa classificação, os macrófagos M2 podem ser subdivididos em M2a, M2b, M2c e M2d induzidos por estímulos a diferentes citocinas, imunocomplexos e glicocorticoides (MARTINEZ et al., 2006). Assim, o perfil de ativação/polarização dos macrófagos vai depender do microambiente e do tecido no qual estão inseridos (PIXLEY; STANLEY, 2004; SOLINAS et al., 2009). O desequilíbrio na população e na ativação dos macrófagos M1 e M2 pode ter efeitos prejudiciais em diversas patologias incluindo o câncer, tuberculose, doença obstrutiva crônica, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, entre outras (BISWAS et al., 2012; OSTUNI et al., 2015).

2.2.1. Origem, características e função

Os macrófagos embrionários se originam a partir da expansão do ectoderma do saco vitelínico, processo denominado hematopoiese primitiva e, é possível observar a presença dessas células a partir do dia embrionário 6,5 em camundongos (SAMOKHVALOV, 2014). Entre os dias embrionários 8,5 e 10,5, células-tronco hematopoiéticas que surgem da região aorta-gonadal-mesonéfrica dão origem a todas as linhagens de células imunológicas. No dia embrionário 10,5 inicia-se a migração das células-tronco hematopoiéticas para o fígado do feto, que a partir de então se torna o principal órgão gerador de células hematopoiéticas durante o restante do desenvolvimento embrionário que termina no dia embrionário 16,5. E finalmente, a partir do período perinatal (P1) as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea tornam-se a fonte principal da hematopoiese das células imunológicas até a fase adulta do organismo (Figura 3) (ORKIN; ZON, 2008; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

Figura 3. Origem das linhagens de macrófagos embrionários e adultos.



A primeira fonte de macrófagos no embrião é o saco vitelínico. À medida que o embrião se desenvolve outros órgãos como o fígado se tornam a principal fonte dessas células no período embrionário E10 até o nascimento, a partir de então, a medula óssea se torna a principal fonte de macrófagos. E6.5, E8.5, E10.5, E16.5 (Estágios embrionários, dias); P1 (período perinatal 1). Fonte: Traduzido de (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

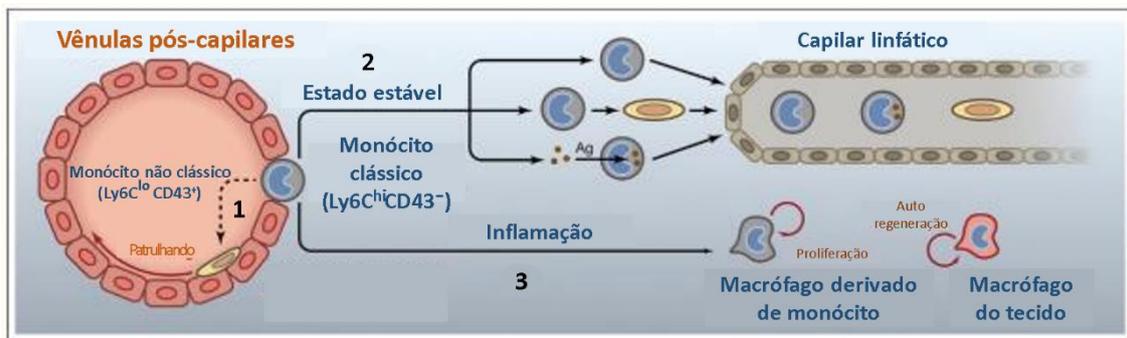
Durante o desenvolvimento do embrião, é possível identificar e diferir os macrófagos que foram derivados do saco vitelínico dos que foram derivados das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, através do fator de transcrição c-Myb e da expressão de marcadores de superfície (CX3CR1, F4/80 e CD11b) (HOEFFEL et al., 2015). Os macrófagos derivados de células-tronco hematopoiéticas possuem o seu desenvolvimento totalmente dependente do fator de transcrição c-Myb, enquanto os derivados do saco vitelínico são independentes de c-Myb. Por outro lado, os macrófagos gerados a partir do saco vitelínico possuem uma expressão de marcadores fenotípicos, característica considerada necessária para a sua identificação como células CX3CR1^{hi}F4/80^{hi}CD11b^{lo} (SCHULZ et al., 2012). Interessantemente, macrófagos gerados durante o desenvolvimento embrionário quando em tecido adulto podem perder ou alterar sua expressão dos marcadores de superfície a medida que o animal vai amadurecendo, dificultando assim o rastreamento das populações de macrófagos (YONA et al., 2013).

Os macrófagos da fase adulta derivam-se dos monócitos, células originadas a partir de uma célula-tronco hematopoiética da medula óssea que circulam no sangue e no sistema linfático sendo recrutadas para o sítio de inflamação e/ou dano tecidual (GEISSMANN et al., 2010; VAN FURTH; COHN, 1968). A migração dos monócitos para o tecido pode culminar na sua diferenciação em macrófagos, sendo que o

microambiente inflamatório e os estímulos presentes são fatores determinantes esta diferenciação (SERBINA et al., 2008).

Existem dois subtipos principais de monócitos, os monócitos clássicos ($\text{Ly6C}^{\text{high}} \text{CD43}^-$) e os monócitos não clássicos ($\text{Ly6C}^{\text{low}} \text{CD43}^+$). Conforme mostrado na figura 4, nos capilares, os monócitos clássicos dão origem aos monócitos não clássicos (1), que atuam fazendo um patrulhamento na superfície das células endoteliais para a remoção de células mortas. No estado estável, os monócitos clássicos, podem migrar da corrente sanguínea tendo a capacidade de realizar o patrulhamento em outros tecidos, e uma parte dessas células podem ainda se diferenciar em monócitos não clássicos (2). Na inflamação, os monócitos clássicos migram para o microambiente inflamatório dando origem aos macrófagos. No entanto, os macrófagos derivados de monócitos possuem diferenças entre os que ali residem, visto que a grande maioria dos macrófagos residentes são derivados da embriogênese e possuem a capacidade de auto regeneração tecidual (3) (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014; HETTINGER et al., 2013).

Figura 4. Subtipos de monócitos no estado estável e na inflamação.



Esquema do ciclo dos monócitos nos tecidos em repouso e inflamado. Nos tecidos em repouso, (1) monócitos não clássicos ($\text{Ly6C}^{\text{lo}} \text{CD43}^+$) são originados a partir dos monócitos clássicos ($\text{Ly6C}^{\text{hi}} \text{CD43}^-$), e atuam patrulhando a superfície intravascular das células endoteliais. (2) Os monócitos clássicos podem migrar da corrente e fazer o patrulhamento nos tecidos extravasculares. (3) Na inflamação, os monócitos clássicos migram da corrente sanguínea até o tecido inflamado, e se diferenciam em macrófagos. Fonte: Traduzido de (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

No microambiente inflamatório, os macrófagos derivados de monócitos podem responder a diversos estímulos podendo originar macrófagos pró-inflamatórios (perfil M1) ou macrófagos anti-inflamatórios (perfil M2). Esses dois tipos celulares, embora seja gerado a partir de um progenitor em comum, possuem características distintas e específicas que difere cada tipo celular (Tabela 1).

Tabela 1. Marcadores característicos dos macrófagos classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2).

<i>Macrófagos pró-inflamatórios (M1)</i>	
Marcador	Função
CD80/CD86	Fornecer sinais coestimulatórios para a ativação e sobrevivência de células T.
TLR-4	Receptor de ativação
iNOS	Produz NO e citrulina a partir de arginina para eliminar patógenos
MHC-II	Apresentação de antígenos
TNF-α	Apoptose celular, indução da inflamação
IL-1α/IL-1β	Medeia a resposta inflamatória, danos teciduais
IL-6	Diferenciação de células B
CCL3 (MIP-1α)	Recrutamento e ativação de leucócitos
NF-κB/STAT1/ STAT5/IRF3/	Controle da expressão de diversos genes ligados a resposta inflamatória
<i>Macrófagos anti-inflamatórios (M2)</i>	
Marcador	Função
CD163	Receptor para o complexo de hemoglobina-haptoglobina
CD206	Medeia a fagocitose e endocitose
Arg1	Produção de prolina e poliaminas essenciais na proliferação e síntese de colágeno
TGF-β	Proliferação e diferenciação celular
IL-10	Citocina anti-inflamatória
Ym1/2	Promove a expressão de citocinas Th2
RELMα	Pode promover a deposição de matriz extracelular
VEGF	Promove a angiogênese, recrutamento e polarização de macrófagos M2
STAT3/STAT6/IRF4	Controla processos celulares: proliferação e sobrevivência
PPARδ/PPARγ	Inibe fatores inflamatórios

cMaf	Essencial para a expressão de IL-10
cMyc	Regula positivamente as ciclinas

Fonte: Autor, 2022.

Os macrófagos pró-inflamatórios (M1), atuam promovendo a inflamação por meio da secreção de citocinas, possuem alta atividade microbicida, produzem espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos anti-inflamatórios (M2), secretam citocinas supressoras da inflamação, regulando a resposta imune e atuando no controle de parasitoses, na remodelação e cicatrização de tecidos danificados, estando ainda envolvidos no desenvolvimento de tumores (MURRAY; WYNN, 2011).

2.2.2. Ativação

Os macrófagos derivados de monócitos, no microambiente inflamatório, podem receber diferentes estímulos culminando em sua ativação/polarização. A ativação dos macrófagos é classificada em ativação clássica ou alternativa a depender dos estímulos presentes. A ativação clássica ocorre em resposta ao interferon- γ (IFN- γ), a estímulos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS), a citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e a fatores de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Esses estímulos resultam na diferenciação dos macrófagos M1 ativados classicamente, uma população de células que possui uma alta capacidade microbicida e tumoricida (O'SHEA; MURRAY, 2008).

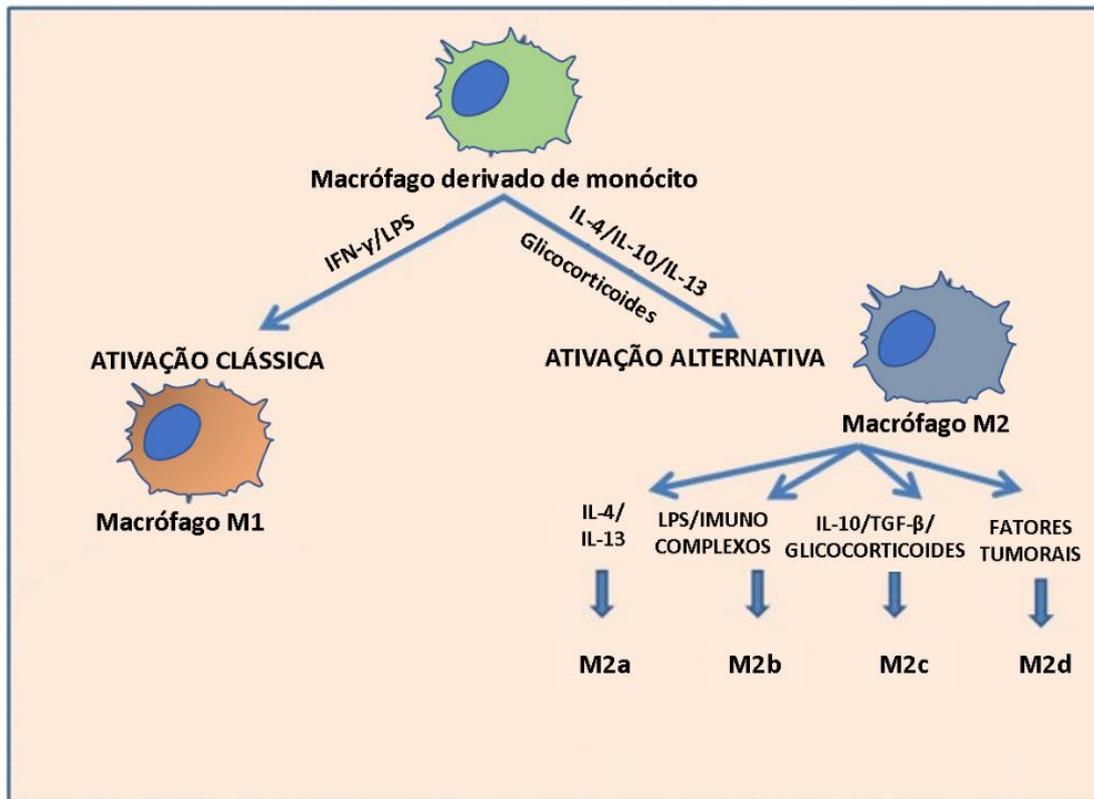
O IFN- γ pode ser produzido por células da resposta imune inata ou adaptativa, sendo secretado principalmente por linfócitos T CD4⁺ de perfil Th1, linfócitos T CD8⁺ células natural killer (NKs) (WANG et al., 2012) e células linfoides inatas (ILCs) (PANDA; COLONNA, 2019). O IFN- γ estimula os macrófagos a secretarem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-23 e TNF- α), produzir espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, aumentando assim a sua capacidade de eliminar os patógenos (DALE; BOXER; LILES, 2008).

O LPS é um constituinte da membrana externa das bactérias Gram-negativas, que é um padrão molecular associado a patógeno (PAMP) reconhecido pelo complexo CD14 e receptor do tipo Toll- (TLR-4), levando a ativação dos macrófagos para um perfil M1 (microbicida, inflamatório) (GUHA; MACKMAN, 2001).

Assim como os macrófagos M1, existem vários fatores que estimulam a ativação dos macrófagos M2, incluindo citocinas como IL-4, IL-13, IL-10, glicocorticoides, complexos de imunoglobulinas ou ligantes de receptores do tipo Toll (TLRs). Os macrófagos estimulados *in vitro* com IL-4 ou IL-13 geralmente não apresentam antígenos ao linfócitos T, e o nível de produção de citocinas pró-inflamatórias são mínimos (EDWARDS et al., 2006). Estas células secretam citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) e fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteases (MMPs). Estas células fazem parte da resposta imune de perfil Th2 (MURRAY, 2017) (VINOGRADOV; WARREN; WEI, 2014). De acordo com o perfil genético os macrófagos M2 podem ainda ser divididos em subgrupos: M2a, M2b, M2c e M2d (MARTINEZ; GORDON, 2014).

O subtipo mais comum de macrófago ativado alternativamente é o M2a que é ativado pelas interleucinas 4 e 13 (IL-4 e IL-13), que é produzido e secretado principalmente pelos mastócitos, basófilos e células da resposta Th2. Essas citocinas regulam negativamente moléculas MHC-II e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 β) (GRATCHEV et al., 2001; HART et al., 1989). O subtipo M2b é estimulado por complexos imunes combinado com LPS que é caracterizado pela alta produção de IL-10. O terceiro subtipo M2c é gerado por estímulos de glicocorticoides. Esses macrófagos secretam IL-10, TGF- β , CCL16 e CCL18 e possuem papéis cruciais no processo de fagocitose de células apoptóticas (ZIZZO et al., 2012). E, por fim, os macrófagos M2d são caracterizados pela alta produção de IL-10. Evidências mostram que esse subtipo de macrófago M2 está associado a tumor (TAM) e desempenha um papel importante na angiogênese e progressão tumoral (ANDERSON; MOSSER, 2002; GUO et al., 2013; WANG et al., 2010) (Figura 5).

Figura 5. Ativação e polarização dos macrófagos M1 e M2.



Fonte: Adaptada de (ARORA et al., 2018) (YAO; XU; JIN, 2019).

A polarização dos macrófagos culmina numa cascata de sinalização e ativação de moléculas intracelulares, fatores de transcrição e reguladores pós-transcricionais que são determinantes para a diferenciação no fenótipo M1 ou M2. Os principais fatores de transcrição envolvidos na ativação/polarização dos macrófagos são as STATs (transdutor de sinal e ativador de transcrição), IRFs (fator regulador de interferon) e NF-κB (fator nuclear kappa B) (KRAUSGRUBER et al., 2011; OHMORI; HAMILTON, 1997; ROY; SARKAR; BASAK, 2018).

Na ativação clássica, o estímulo com interferons (IFN-α e IFN-γ) ativam vias IRF e STAT (LEHTONEN; MATIKAINEN; JULKUNEN, 1997). O IRF5 é regulado positivamente e induz a produção de citocinas envolvidas nas respostas Th1 e Th17 (IL-12, IL-23 e TNF) (KRAUSGRUBER et al., 2011; SICA; BRONTE, 2007). Na ativação alternativa, o estímulo com IL-4 e IL-13 ativa a via STAT-6, que consequentemente ativa PPARγ e PPARδ, importantes para transcrição de genes característicos de M2 (ODEGAARD et al., 2007, 2008). A STAT6 também coordena a ativação do fator KLF4,

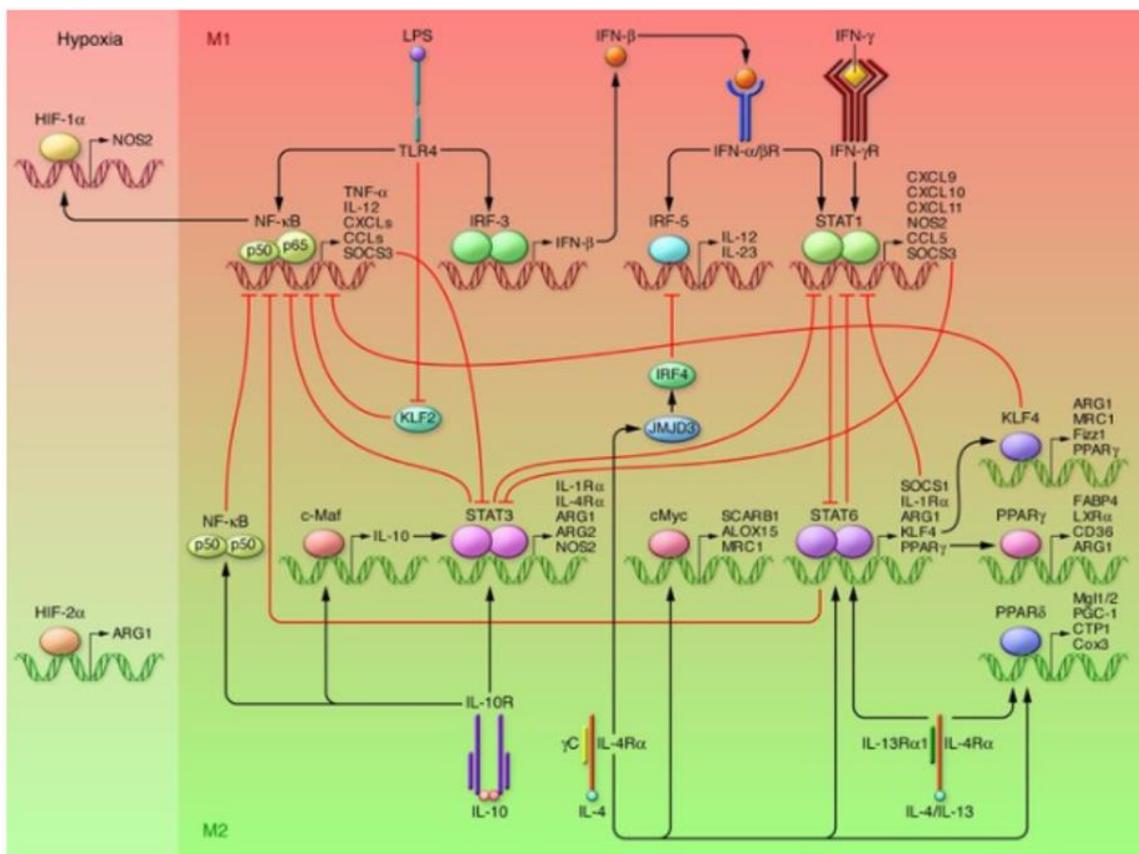
que contribui para a indução dos genes Arg1, Mrc1, Fizz1, característicos de M2 e inibe genes de M1 como o TNF α , Cox-2, CCL5 e iNOS (SAHA et al., 2015).

O supressor de sinalização de citocinas (SOCS) é quem regula a ativação mediada pela via STAT, em ambos os fenótipos. Em M1, o INF- γ regula positivamente SOCS3, que inibe, conseqüentemente, a ativação de STAT1. Em M2, IL-4 regula positivamente SOCS1, inibindo a ativação de STAT3 (LIU et al., 2008; WHYTE et al., 2011).

O fator de transcrição NF-kB é ativado a partir da estimulação dos TLRs, mediando a produção de genes inflamatórios que estão associados ao perfil M1 de macrófagos (POMERANTZ; BALTIMORE, 2002). A inibição de NF-kB é dada por meio de dois fatores (KLF2 e KLF4), que estão envolvidos na polarização para um fenótipo M2, que sequestram um complexo coativador de NF-kB (MAHABELESWAR et al., 2011)

Os mecanismos de polarização de macrófagos estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6. Mecanismos e principais vias de polarização dos macrófagos M1 e M2.



A ativação de STAT1, STAT3 e STAT6 regula a polarização e a atividade dos macrófagos. A ativação de NF-kB e STAT1 promove a polarização de macrófagos M1. Por outro lado, a ativação de STAT3 e STAT6 resulta na polarização de macrófagos M2, associada à supressão imunológica e progressão tumoral. PPAR γ

e PPAR δ controlam aspectos da ativação de macrófagos M2 e do metabolismo oxidativo. KLF4 e KLF2 atuam promovendo as funções de macrófagos M2 cooperando com STAT6 e suprimindo a transcrição de NF- κ B / HIF-1 α . A atividade de c-Myc induzida por IL-4 controla um subconjunto de genes associados a M2. IL-4 também induz o eixo Jmjd3-IRF4 de polarização M2 para inibir a polarização M1 mediada por IRF5. IL-10 promove a polarização M2 por meio da indução de atividades de p50 NF- κ B, c-Maf e STAT3. Fonte: (SICA; MANTOVANI, 2012).

É importante ressaltar que o macrófago possui uma alta plasticidade fenotípica podendo assim ser ativado classicamente (M1) e posteriormente reprogramar toda a sua maquinaria celular para um perfil M2, dependendo dos estímulos que a célula recebe (GUIDUCCI et al., 2005). Toda essa cascata de sinalização irá culminar na polarização de um macrófago M1 ou M2 e na reprogramação de um perfil pró-inflamatório para um anti-inflamatório ou vice-versa.

2.2.3. O papel dos macrófagos na inflamação

. A resposta imunológica dos macrófagos é iniciada através do recrutamento ativo dos monócitos inflamatórios (Ly6C^{high} CD43⁻) para o sítio de infecção, onde recebem estímulos para se diferenciar em macrófagos. Após a diferenciação, os macrófagos são capazes de fazer o reconhecimento, fagocitose e processamento de antígenos. Além disso, os macrófagos produzem moléculas biologicamente ativas (citocinas) que irão atuar nas respostas imunes inatas e adaptativas (LEE; CHOI, 2018). Na inflamação, os macrófagos desempenham pelo menos três funções principais: fagocitose, apresentação de antígenos e imunomodulação (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

2.2.3.1. Fagocitose

Os macrófagos são considerados fagócitos profissionais, pois desempenham essa função com alta eficiência (VAN FURTH et al., 1972). Os macrófagos podem fagocitar corpos apoptóticos, células mortas e patógenos, como bactérias, vírus e fungos. Estas células possuem vesículas intracelulares denominadas lisossomos e fagolisossomos, que apresentam mecanismos microbicidas que são necessários para a morte microbiana. Para que a fagocitose aconteça, é necessário o reconhecimento do microrganismo através dos receptores na superfície celular, incluindo os receptores de manose, receptores para opsoninas e os TLRs (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). Os TLRs fazem o reconhecimento de diversos PAMPs incluindo o LPS, peptidoglicano, ácido lipoteicoico

e flagelina, mediando a fagocitose e a ativação dos macrófagos (ROT; VON ANDRIAN, 2004). Além disso, a fagocitose de patógenos revestidos por anticorpos, proteínas do complemento e lectinas é mediada pelos receptores para opsoninas. Os receptores para região Fc de imunoglobulinas contribuem para a fagocitose de patógenos opsonizados por anticorpos.

2.2.3.2. Apresentação de antígenos

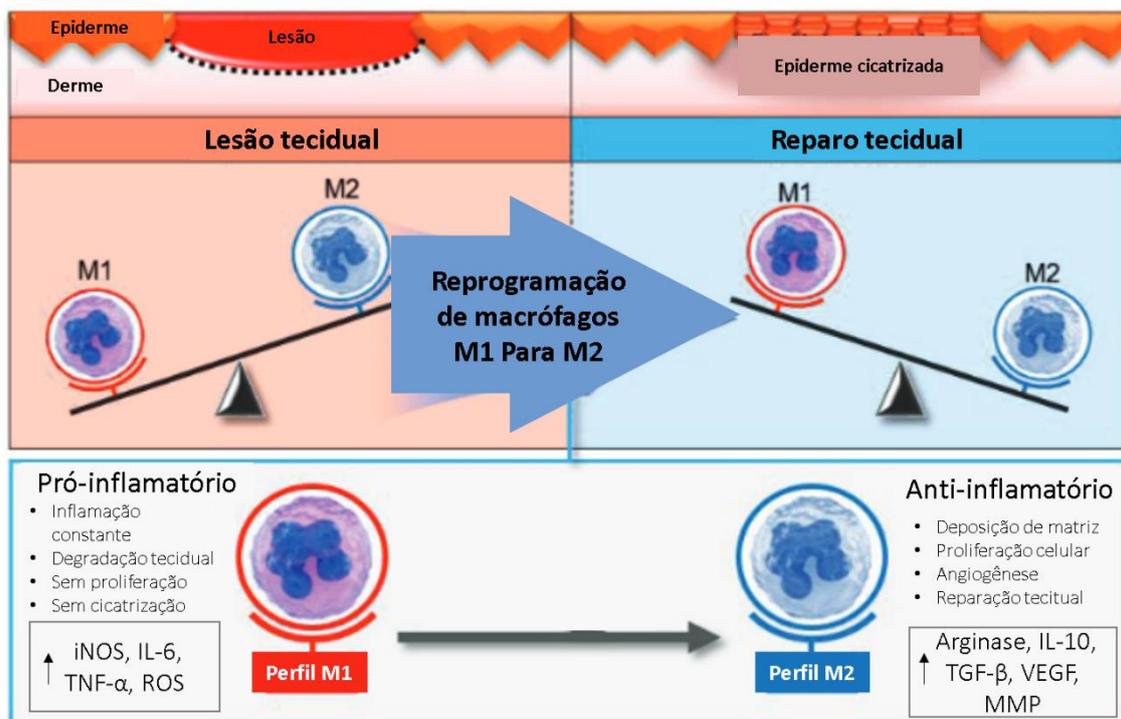
Uma célula apresentadora de antígenos (APC) é uma célula que detecta uma partícula estranha, por meios de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que ao serem estimulados ativam a célula levando a produção de citocinas, substâncias microbidas (NO-Óxido Nítrico e ROS-Espécies Reativas de Oxigênio) e quimiocinas que promovem a migração leucocitária para o sítio de inflamação (UNDERHILL; OZINSKY, 2002). Os macrófagos são APCs profissionais, que desempenham um papel importante na detecção e eliminação de corpos estranhos. Após o reconhecimento, os macrófagos ingerem o patógeno (via fagocitose p. ex.) digerindo-o em vários fragmentos peptídicos. Esses peptídeos são então associados as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e transportados para a superfície celular sendo apresentados, aos linfócitos T auxiliares (T CD4+), sendo este o primeiro sinal para a ativação dessas células. As células T CD4+ reconhecem o antígeno por meio do receptor de célula T (TCR) e recebem os sinais co-estimuladores por meio do receptor CD28, ambos expressos em sua superfície celular.

2.2.3.3. Imunomodulação

Os macrófagos são uma das principais células que atuam no controle das respostas imunológicas, estimulando a resposta imune ou promovendo a cicatrização e reparo tecidual. Quando ativados, os macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, TNF- α e IL-1 β , que atuam promovendo a inflamação por meio da ativação de neutrófilos, proliferação de linfócitos B, produção de anticorpos e recrutamento de monócitos e neutrófilos para o local da infecção. Além disso, os macrófagos também produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β que atuam suprimindo a produção de citocinas inflamatórias, no controle da proliferação de células B (ANDERSON; MOSSER, 2002). Neste contexto, os macrófagos M1 e M2 tendem a

manter o equilíbrio do processo inflamatório, desde o início, progressão e resolução onde não havendo esse equilíbrio a inflamação pode ser prejudicial ao organismo (ARDURA et al., 2019) (Figura 7).

Figura 7. O papel de macrófagos M1 e M2 na inflamação e reparo tecidual.



A reprogramação de macrófagos M1 para M2 mantém o equilíbrio das respostas inflamatórias. O desequilíbrio das populações M1 ou M2 de macrófagos, podem estar envolvidos em diversas doenças. Fonte: Traduzida de (KIM et al., 2019a).

Assim, visto que os macrófagos estão envolvidos em diversas doenças inflamatórias, essas células tornam-se um alvo para a descoberta de novos compostos imunomoduladores e terapias imunológicas que possam suprimir ou estimular estas células, incluindo-se os compostos de origem natural.

2.3. Produtos naturais

Os produtos naturais tem desempenhado um papel fundamental na descoberta de novos fármacos e terapias imunológicas (NEWTON et al., 2002). A propagação da resistência microbiana e efeitos colaterais tem chamado a atenção para as terapias com

produtos naturais para o tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas (ARA et al., 2018; GINWALA et al., 2019; KIM; KISMALI; GUPTA, 2018)

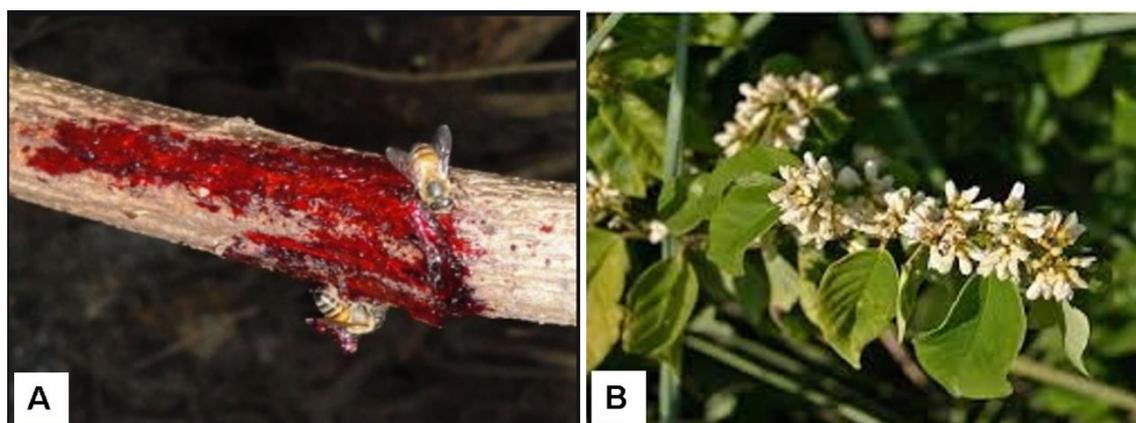
A imunomodulação possui um papel muito importante na homeostase do organismo. Dessa forma, faz-se necessário o estudo por imunomoduladores naturais a fim de anemizar os efeitos colaterais e os danos aos tecidos em doenças inflamatórias de reverter o quadro patológico (ARRUDA et al., 2017). A própolis é um produto natural que vem sendo utilizado pela humanidade devido aos seus benefícios a saúde humana (ZULHENDRI et al., 2021).

2.4. Própolis vermelha

A própolis é uma substância natural complexa, produzida a partir da coleta do exsudato de plantas por abelhas, que podem sofrer alterações por ações de enzimas salivares (WAGH, 2013). A própolis é um produto utilizado pelas abelhas para a construção, reparação das colmeias, proteção da ação de microrganismos e invasores externos, além de um isolamento térmico (BURDOCK, 1998). A cor, sabor e o aroma da própolis podem variar de acordo com a origem botânica (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000). No Brasil, foram registradas 13 tipos de própolis até o momento, que foram classificadas de acordo com a sua coloração (MARASCHIN et al., 2016).

Dentre as própolis brasileiras, podemos destacar a própolis vermelha (PV), sua ocorrência foi registrada pela primeira vez em meados de 2007 em uma área de mangue no estado de Alagoas, na região nordeste do Brasil e classificada como um novo tipo de própolis brasileira, alocada na classificação 13 (ALENCAR et al., 2007). A PV é obtida por abelhas *Apis mellifera* através da coleta de resinas de plantas da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (Figura 8), a qual é responsável pela coloração vermelha da própolis (DAUGSCH et al., 2008a). Estudos fitoquímicos identificaram compostos fenólicos presentes na PV e que estão presentes no exsudato da *Dalbergia ecastophyllum*, comprovando sua origem botânica (PICCINELLI et al., 2011; SILVA et al., 2008). *D. ecastophyllum* é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae e possui longas raízes e, ramos e caules que facilitam a fixação nas regiões arenosas, sendo encontrada principalmente nos leitos de rios de manguezais (DAUGSCH et al., 2008a).

Figura 8. Origem botânica da própolis vermelha.



(A) Abelhas da espécie *Apis mellifera* coletando o exsudato de coloração vermelha na superfície dos caules da leguminosa *Dalbergia ecastophillum* para a produção da própolis. (B) Inflorescência de *Dalbergia ecastophillum*, origem botânica da própolis vermelha. Fonte: Adaptado de (SUGAWARA; NIKAIDO, 2014).

Além da coloração e da origem botânica, a PV se diferencia das demais própolis devido ao alto teor de flavonoides presente em sua composição (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016) que já foram relatados na literatura exercendo diversas atividades biológicas (DE FREITAS et al., 2018). Particularmente, as plantas leguminosas são ricas em flavonoides (HEGNAUER; J. GPAYER-BARKMEIJER, 1993), sendo assim, a maioria dos flavonoides encontrados na PV estão relacionados com a sua origem botânica (MOISE; BOBIŞ, 2020).

2.4.1. Composição química

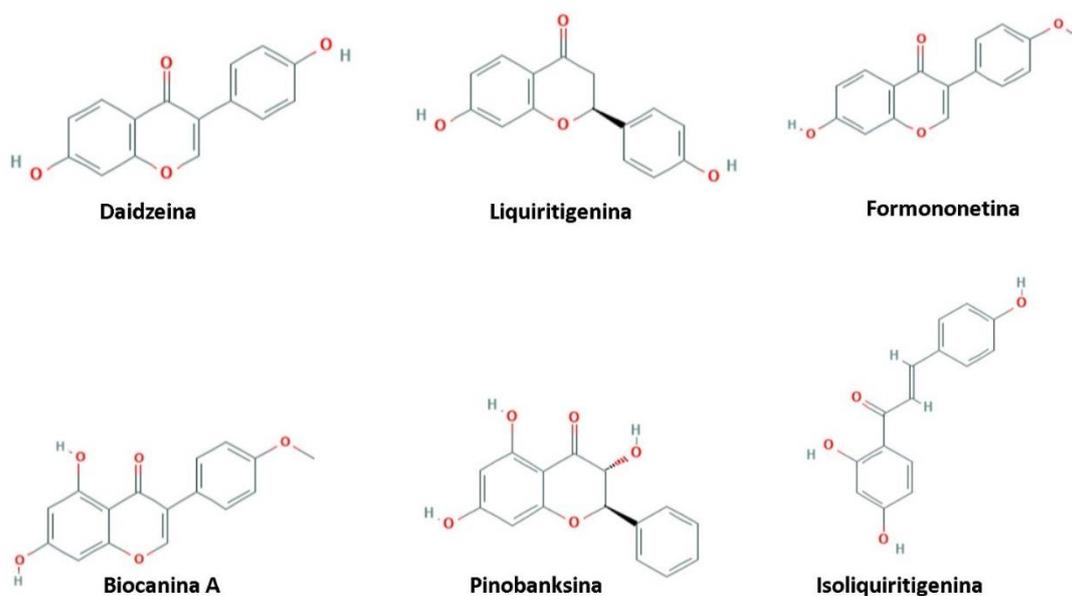
Geralmente a composição química da própolis pode variar de acordo com alguns fatores que incluem a sazonalidade, luz, altitude e posição fitogeográfica (MACHADO et al., 2016). A PV possui um alto teor de flavonoides quando comparado com outros tipos de própolis encontradas no Brasil (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016).

Dentre os principais constituintes químicos já relatados em diversas amostras de PV estão incluídos ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (LUSTOSA et al., 2008). Dentre essas classes de compostos químicos, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos, aos quais são atribuídos diversas atividades biológicas constatadas na própolis (FUNARI; FERRO, 2006). Os flavonoides são a classe de compostos mais abundantes que desempenham importante papel na atividade

antioxidante de extratos de própolis brasileira, embora outros fatores possam estar envolvidos (AHN et al., 2007; DAUGSCH et al., 2008b).

Em uma amostra do extrato de PV coletada no Estado de Alagoas foram identificados isoflavonas (Formononetina, Biocanina A e Daidzeína), chalconas (Isoliquiritigenina) e flavonas (Liquiritigenina e Pinobanksina) por meio da cromatografia (DO NASCIMENTO et al., 2018) (Figura 9).

Figura 9. Compostos químicos encontrados na própolis vermelha de Alagoas.



Alguns compostos detectados na PV coletada no Estado de Alagoas. Liquiritigenina, Daidzeína, Biocanina A, Pinobanksina, Isoliquiritigenina e Formononetina. Fonte: PubChem.

Em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa foram detectadas a chalcona isoliquiritigenina e a isoflavona formononetina no extrato hidroalcoólico da PV de Alagoas (dados ainda não publicados). Vale ressaltar que este mesmo extrato foi utilizado no presente estudo.

2.4.2. Atividades biológicas da própolis vermelha

Vários componentes químicos identificados na PV são responsáveis por diversas propriedades biológicas, conforme mostrado na Tabela 2, incluindo-se as atividades

antibacteriana, antifúngica, antioxidação, anti-inflamatória e imunomoduladora, entre outras.

Tabela 2. Componentes químicos identificados na própolis vermelha brasileira e suas respectivas atividades biológicas.

Fonte: Autor, 2022

Componente	Propriedade biológica	Referência
Medicarpina	Antibacteriana e antifúngica	(Alencar et al. 2007)
Quercetina	Anti-inflamatória	(Alencar et al. 2007)
Ácido ferúlico	Antioxidante	(Alencar et al. 2007)
Daidzeina	Antioxidante	(Alencar et al. 2007)
Gutiferona E	Antibacteriana, antifúngica e antioxidante	(Piccinelli et al. 2011)
Xantocimol	Antibacteriana, antioxidante e antiproliferativa	(Piccinelli et al. 2011)
Isoliquiritigenina	Antibacteriana e anti-inflamatória	(Piccinelli et al. 2011)
Formononetina	Antiproliferativo	(Piccinelli et al. 2011)
Biochanina A	Antiproliferativo	(Piccinelli et al. 2011)
Vestitol	Antibacteriano, anticárie, anti-inflamatório e antioxidante	(Piccinelli et al. 2011) (Bueno-Silva et al. 2013)
Neovestitol	Antibacteriano, anticárie, anti-inflamatório e antioxidante	(Piccinelli et al. 2011) (Bueno-Silva et al. 2013)
3,8-di-hidroxi-9-metoxipterocarpan	Antiproliferativo	(Piccinelli et al. 2011)
Mucronulatol	Antiproliferativo	(Piccinelli et al. 2011)
Naringenina	Antiviral e antioxidante	
Pinocembrina	Antimicrobiana e antiviral	(Simoni et al. 2018)
Lupeol	Antiviral	(Gómez-Calderón et al. 2017)
Liquiritigenina	Antitumoral e anti-inflamatória	(Hu et al. 2010)

Fonte: Autor, 2022.

2.4.2.1. Atividade antimicrobiana e antifúngica

A PV possui um amplo espectro antimicrobiano em bactérias gram-positivas e gram-negativas (SIQUEIRA et al., 2014) e atividade antifúngica a diversas leveduras e dermatófitos (PIPPI et al., 2015). O extrato etanólico da PV é considerado um agente antibacteriano muito potente (FREIRES et al., 2015). A fração clorofórmio é constituída de compostos de baixa polaridade, como vestitol e neovestitol (BUENO-SILVA et al., 2013) e isoliquiritigenina (OLDONI et al., 2011) que são considerados potentes antimicrobianos por causarem danos na membrana citoplasmática, inibindo a síntese de ácidos nucleicos e inibindo também a formação de biofilmes (XIE et al., 2014).

A PV também possui compostos ativos contra leveduras (*Candida* spp. e *S. cerevisiae*) (PIPPI et al., 2015) e dermatófitos (*Trichophyton* spp.) (SIQUEIRA et al., 2009). A medicarpina, por exemplo, se mostrou eficaz contra o crescimento de colônias de *C. albicans* (TRUSHEVA et al., 2006). Também, foram feitos estudos para avaliar o efeito antifúngico da PV associada a outros compostos como a benzofenona e fluconazol afim de potencializar a atividade fungicida em espécies resistentes (PIPPI et al., 2015).

2.4.2.2. Atividade antitumoral

A ação citotóxica da PV tem sido bastante estudada em diversas células de linhagens tumorais, tais como adenocarcinoma cervical humano (HeLa), carcinoma epidermoide laríngeo humano (Hep-2) (DA SILVA FROZZA et al., 2014), leucemia mieloide crônica e aguda (K562) (NOVAK et al., 2014), leucemia precursoras de células B humana (Nalm6) (FRANCHI et al., 2012) e adenocarcinoma de pulmão humano (A549) (LI et al., 2008). Vários compostos como xantoquimol, formononetina, biochanina A, 3,8-di-hidroxi-9-metoxipterocarpan, mucrunolol e liquiritigenina, estão envolvidos nessa atividade citotóxica (Tabela 2). Um crescente número de estudos publicados, têm demonstrado que o extrato e moléculas da PV possuem propriedades antiproliferativas, sinalizando assim o seu potencial no desenvolvimento de novos fármacos e terapias anticâncer.

2.4.2.3. Atividade antioxidante

A própolis vermelha pode desempenhar um papel importante nas vias metabólicas protegendo as células do estresse oxidativo (DALEPRANE; ABDALLA, 2013), o qual está atrelado a várias doenças crônicas (DAENEN et al., 2019). Geralmente os flavonoides possuem ação sequestradora de radicais livres (HOFER; JØRGENSEN;

OLSEN, 2014). Assim, a ação antioxidante foi mostrada para os extratos etanólico, metanólico, as frações clorofórmio e hexano e compostos isolados (guttiferona E, xantoquimol, vestitol e neovestitol) da PV (OLDONI et al., 2011; RIGHI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006).

2.4.2.4. Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora

A PV é um produto natural, rico em metabólitos secundários denominado flavonoides/ isoflavonoides (SILVA et al., 2008) que possuem diversas atividades biológicas incluindo a atividade anti-inflamatória e imunomodulatória (BUENO-SILVA et al., 2016, 2017b). Os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores da PV foram estudados em diversos modelos de inflamação aguda e crônica (ARAUJO et al., 2012). Os flavonoides presentes na PV possuem atividade anti-inflamatória (FUNAKOSHITAGO et al., 2015). A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos após a indução de inflamação foi inibida significativamente após o tratamento com o extrato da própolis vermelha de Alagoas (PVA) e com os compostos isolados vestitol e neovestitol (BUENO-SILVA et al., 2013).

Há uma intensa busca por produtos naturais que possam ser utilizados como fontes alternativas de pesquisa e descoberta de novas intervenções imunológicas que modulam o processo inflamatório. Desta forma este trabalho se propôs a avaliar os efeitos do extrato da própolis vermelha de Alagoas em macrófagos da linhagem J774.A1 ativados por LPS *in vitro*, com o objetivo de corroborar na elucidação dos mecanismos de ação da própolis em macrófagos ativados.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a atividade imunomoduladora do extrato hidroalcolico da própolis vermelha de Alagoas (PVA) e dos compostos isoliquiritigenina (ISL) e formononetina (FMT) em macrófagos murinos estimulados por LPS *in vitro*.

3.2. Específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico (EH) da PVA e das moléculas isoladas isoliquiritigenina ISL e FMT) em monócitos/macrófagos murinos da linhagem celular J774A.1;
- ✓ Analisar as alterações morfológicas decorrentes da ativação de células J774.A1 por LPS por microscopia óptica;
- ✓ Padronizar a ativação *in vitro* de macrófagos J774.A1 por lipopolissacarídeo (LPS);
- ✓ Avaliar a ativação dos macrófagos J774A.1 estimulados com LPS após o tratamento com o EH da PVA, isoliquiritigenina (ISL) ou formonetina (FMT) por meio da imunofenotipagem de superfície dos marcadores F4/80 e CD86;
- ✓ Quantificar as citocinas IL-6, IL-10, TNF, IL-1 β , IL-8 e IL12p70 no sobrenadante dos macrófagos estimulados por LPS após o tratamento com o EH da PVA;
- ✓ Avaliar a ativação de vias de sinalização de MAPKs por meio da marcação intracelular de p38 e ERK1/2 fosforiladas após o tratamento de macrófagos J774.A1 estimulados com LPS com o EH da PVA, ISL ou FMT;
- ✓ Avaliar a expressão gênica dos genes *Arg1*, *iNOS*, *TGF- β* , *Lamp2*, *MIP-1 α* , *Ccne1*, *HO-1* e *SOCS3* após o tratamento com o EH da PVA ou ISL.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo celular

Os macrófagos murinos J774 A.1 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara do Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental (LICE/UNIFESP). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM-HG) (Sigma-Aldrich, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™) e 1% de solução antibiótica e antimicótica e, mantidas em estufa a 37°C a 5% de CO₂ sendo realizadas manutenções a cada 3 dias (troca de meio ou expansão).

4.2. Extrato da própolis vermelha de Alagoas e compostos isolados

Os materiais testes utilizados neste estudo foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (ICF-UFAL). A PVA foi coletada no apiário localizado na cidade de Marechal Deodoro, sendo posteriormente macerada e solubilizada com 80% de etanol e 20% de água, agitada e incubada por 48 h para a extração do extrato hidroalcolico (EH). Após a extração, o EH foi secado em um rotaevaporador para obter um extrato bruto livre de solventes. O EH e os compostos isolados isoliquiritigenina (ISL, Sigma Aldrich®) e formononetina (FMT, Sigma Aldrich®), foram solubilizados em DMSO para obtenção de uma solução estoque com as seguintes concentrações: 500 mg/mL para o EH, e 400 mM/mL para a ISL e FMT. A partir da solução estoque cada material teste foi diluído em meio DMEM High (10% SBF) para a obtenção de uma solução intermediária nas concentrações de 10.000 µg/mL para EH e 4000 µM para ISL e FMT.

4.3. Viabilidade celular e Citotoxicidade do EH, ISL e FMT

Para determinar a concentração máxima não tóxica da PV, foi utilizado o ensaio de MTT (MOSMANN, 1983). Para a realização do testes, as células J774 A.1 (2×10^4 células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações do EH da PVA (1,56 a 200 µg/mL) e dos compostos ISL ou FMT (1,56 a 200 µM), e, incubadas em microplacas de 96 poços, em estufa à 37°C contendo 5% de CO₂, pelo período de 48h. Após a incubação, foi adicionado 20µl da solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazólil) (5mg/mL) (Sigma Aldrich®) nos poços seguido de incubação, nas

mesmas condições, por 3 h. Posteriormente o sobrenadante foi removido cuidadosamente, e os cristais de formazan formados pela redução do MTT pelas células viáveis foram dissolvidos pela incubação com 150µl de DMSO durante 15 minutos (37°C, 5% de CO₂). Células sem tratamento foram utilizadas como controle (onde foi adicionado o DMSO nas mesmas concentrações da PVA e dos compostos), correspondendo a 100% de viabilidade. Ao final da dissolução dos cristais de formazan, foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro (Termo Plate®), utilizando o comprimento de onda de 492nm. As absorbâncias (Abs) das triplicatas foram utilizadas para o cálculo das porcentagens de viabilidade celular utilizando a fórmula:

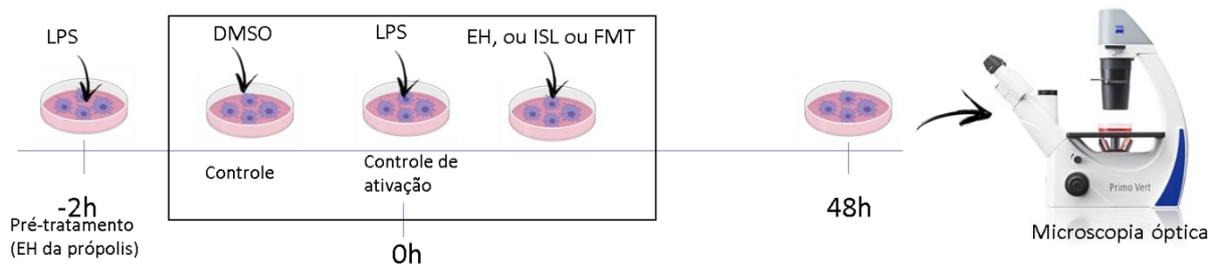
$$\text{Viab. Cel. (\%)} = \frac{\text{Abs. Da amostra} - \text{Média Abs. Controle branco}}{\text{Média Abs. do controle celular} - \text{Média Abs. do controle branco}} \times 100$$

A Concentração máxima não tóxica (CMNT) foi determinada a partir das concentrações onde a viabilidade celular não apresentava diferença significativa comparada ao controle (veículo/DMSO).

4.4. Ativação e tratamento dos macrófagos com a própolis vermelha

Os macrófagos foram ativados com 200 ng/mL de LPS e tratados com o EH da PVA, em diferentes condições experimentais, sendo adicionado simultaneamente ao LPS ou realizado o tratamento com EH 2h antes de adicionar o LPS. Nas células tratadas com ISL e FMT, o LPS foi adicionado simultaneamente aos compostos, na concentração de 25 µM, máxima não tóxica para as células, e em seguidas incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 48h. Nos controles, foi adicionado DMSO (nas mesmas concentrações da própolis 0.01%, controle negativo) e LPS (controle de ativação) (Figura 10). Nos controles, foi adicionado DMSO (nas mesmas concentrações da própolis 0.01%, controle negativo) e LPS (controle de ativação) (Figura 10). Após 48h, foi realizada uma análise morfológica por microscopia óptica com o auxílio do microscópio invertido Zeiss®. Cada condição experimental foi fotografada (aumento de 20x e 40x) com auxílio de uma câmera fotográfica. Posteriormente, os sobrenadantes dos macrófagos foram coletados, centrifugados e congelados para posterior análise.

Figura 10. Esquema do desenho experimental e análise microscópica



As células J774A.1 foram tratadas em diferentes condições experimentais. No tempo -2h foi realizado o pré-tratamento com o extrato da PVA 2 horas antes do estímulo com o LPS. No tempo 0h tanto o EH como os compostos isolados foram adicionados aos poços respectivos, juntamente com o LPS, seguido de incubação por 48h. Após, foi realizada uma análise morfológica com o auxílio de um microscópio invertido (Zeiss®).

4.5. Análise da expressão de F4/80 e CD86 por citometria de fluxo

Após a ativação e tratamento com o extrato EH da PVA, ISL ou FMT, os macrófagos foram desagregados da placa de cultivo com auxílio do PBS (1x) gelado acrescido de EDTA (10 μ M) e transferidos para tubos de citometria, onde foram incubadas com um reagente bloqueador de receptores para região Fc murinos anti-CD16/32 (Mouse Fc Block™, BD Biosciences) por 5 minutos em temperatura ambiente, para minimizar ligações inespecíficas de imunoglobulinas a estes receptores. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpos anti-F4/80 conjugado ao fluorocromo PE (Biolegend-123110) e anti-CD86 conjugado ao fluorocromo APC (Biolegend-105012) por 30 minutos a 4°C, protegido da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com o tampão FACS (PBS 1x contendo 2% de SBF), e fixadas com Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) (caso o tempo para a aquisição das amostras ultrapassasse 24h). As amostras foram então adquiridas no citômetro FACSCanto II e os dados foram analisados no software FlowJo v.7.

4.6. Quantificação de citocinas no sobrenadante dos macrófagos

A quantificação das citocinas IL-6, TNF e IL-10 nos sobrenadantes do cultivo de macrófagos foi realizada por citometria de fluxo pela metodologia de “Cytometric Bead Array” (CBA) utilizando-se o kit BD *Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD

Biosciences) seguindo as orientações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram suspensas em 150 µL de *Wash Buffer* e adquiridas no equipamento BD FACSCanto II ou BD FACSVia e a análise dos resultados foi realizada no software FCAP Array v.3.0 (SoftFlow).

4.7. Análise da ativação das vias ERK1/2 e p38

A fosforilação das proteínas ERK1/2 e p38 MAPK foi avaliada por meio da marcação intracelular utilizando-se os anticorpos monoclonais PE Mouse Anti-ERK1/2 (pT202/pY204) e Alexa Fluor 647 Mouse Anti-p38 MAPK (pT180/pY182) (BD Biosciences). A marcação foi realizada de acordo com os protocolos recomendados pelo fabricante (BD Biosciences). Resumidamente, após 48h do estímulo com LPS e tratamento com o extrato da PVA e com o composto ISL, as células foram destacadas da placa de cultivo com PBS/EDTA (10 µM), e em seguida, transferidas para tubos de citometria e então centrifugadas (3000 rpm por 5 min). Posteriormente, as células foram fixadas com o tampão Cytofix/Cytoperm (200 µL por tubo) por 20 minutos a 4°C, protegido da luz. Ao término da incubação, as células foram submetidas a lavagem e centrifugação (3000 rpm por 5 min) com 1mL de tampão FACS. Após a centrifugação, foi adicionado 200 µL de metanol (90-100%) gelado, por tubo e incubados por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram submetidas, novamente, a lavagem e centrifugação para a remoção do metanol. Após centrifugação para retirada do metanol, as células foram incubadas com reagente FcBlock (CD16/32 – BD Biosciences) por 5 min e então incubadas com os anticorpos correspondentes para detecção da fosforilação de ERK1/2 ou p38 MAPK por 1 hora a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com tampão FACS, centrifugadas e o pellet de células foi suspenso em 300µl de FACS e levadas para a aquisição no equipamento BD FACSVia (BD Biosciences).

4.8. Extração e quantificação de RNA para avaliação da expressão gênica

As células tratadas (1×10^6 células) com o extrato da PVA ou com o composto ISL foram submetidas a extração de RNA total seguindo o protocolo de extração por TRIzol™ (Invitrogen). Resumidamente, os macrófagos estimulados com LPS e tratados com o extrato hidroalcolico da PVA ou isoliquiritigenina (ISL) foram retirados da placa de cultivo de 24 poços, com o auxílio de PBS/EDTA e transferidos para microtubos RNAase free, centrifugados e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi adicionado 1mL de

TRIzol™ em cada microtubo e incubado por 5 min. Após a incubação foi adicionado 200 µL de clorofórmio e misturado vigorosamente com um auxílio de um agitador de tubos (VORTEX®) durante 15s. Em seguida, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 2-3 min e, posteriormente centrifugados. Após a centrifugação, foi realizada a transferência de 700µl da fase contendo o RNA para um novo tubo e adicionado 700µl etanol (EtOH 70%) e em seguida centrifugado e prosseguido com lavagens e eluição do RNA. O RNA eluído foi quantificado pelo fluorímetro Qubit 4 (Thermo Scientific) seguindo o protocolo do *Kit Qubit™ RNA XR Assay* (Thermo Scientific).

4.9. qRT-PCR

O cDNA foi transcrito seguindo o protocolo do *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. A reação de síntese de cDNA foi preparada a partir de 1 µg do RNA total. Ao final, o cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento do uso. Foram misturados em uma placa de 96 poços específica para real time 10 µL de SYBR® Green (Applied Biosystems), 3,2 µM dos primers desenhados especificamente com o programa PRIMER3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para regiões específicas dos genes de interesse (Tabela 3) e 5 µL do cDNA diluído 8x.

Tabela 3. Primers utilizados na análise da expressão gênica

Gene	Foward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>NOS2</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	95
<i>ARG1</i>	AAAGCTGGTCTGCTGGAAAA	ACAGACCGTGGGTTCTTCAC	122
<i>LAMP2</i>	ATTGGGGTATTCACCTGCAA	TGGTGGGAGTTTGGTCTTCT	87
<i>TGFβ</i>	GCTAGACCGTTTGCTTCAGG	TCCTCCTTCTCTCCCCTTC	108
<i>CCL3</i>	ACCATGACACTCTGCAACCA	GATGAATTGGCGTGGAATCT	102
<i>SOCS3</i>	AGCTCCAAAAGCGAGTACCA	AGCTGTCGCGGATAAGAAAG	145
<i>CCNE1</i>	TTCGGGTCTGAGTTCCAAGC	TGCAAAAACACGGCCACATT	144
<i>HO1</i>	GCCGAGAATGCTGAGTTCATG	TGGTACAAGGAAGCCATCACC	86

O volume final da reação foi de 20 μ L e os experimentos foram realizados em triplicata. A qRT-PCR foi realizada no termociclador automático (QuantStudio3™). As alterações na expressão gênica dos genes alvo foram calculadas pela normalização de acordo com os valores de expressão do gene endógeno GAPDH, e os valores de expressão relativa foram obtidos utilizando o método do CT comparativo ($\Delta\Delta$ CT).

4.10. Análises estatísticas

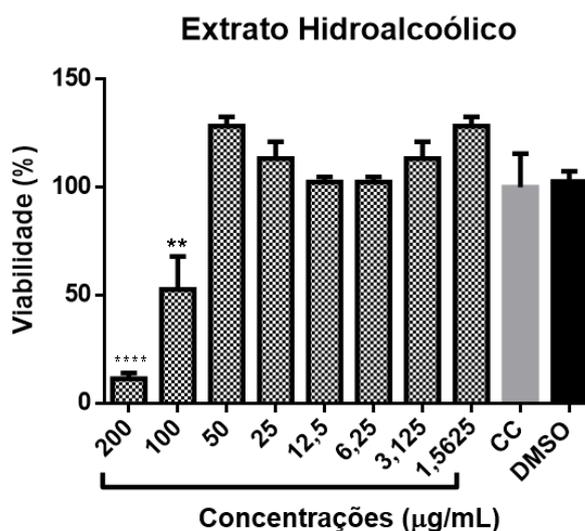
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 6, utilizando o teste T de *Student* não-pareado para a análise de dois grupos ou ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnett ou Tukey para análise de mais de dois grupos. Foi considerado o valor de $p \leq 0,05$ para diferenças significativas.

5. RESULTADOS

5.1. Análise da citotoxicidade do EH da PVA, ISL e FMT em macrófagos J774A.1

Inicialmente as células J774A.1 tratadas com diferentes concentrações do EH da PVA ou com os compostos ISL ou FMT para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT). As concentrações de 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do EH da PVA foram citotóxicas reduzindo significativamente a viabilidade celular quando comparados com o controle celular negativo (DMSO). Assim, a CMNT obtida para o EH da PVA foi de 50 $\mu\text{g/mL}$, conforme mostrado na Figura 11.

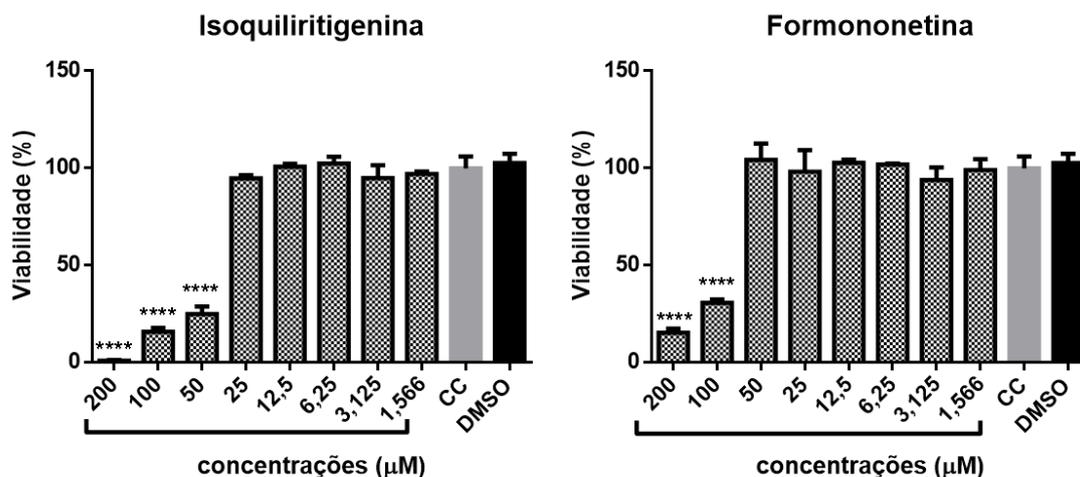
Figura 11. Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 após tratamento com o extrato hidroalcoólico (EH) da própolis vermelha de Alagoas (PVA)



Células J774A.1 foram tratadas com diferentes concentrações do EH da PVA por 48 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (**** $p \leq 0,0001$ e ** $p \leq 0,01$ comparado ao DMSO).

Em relação à ISL e FMT, foi possível observar que as CMNTs obtidas foram 25 μM e 50 μM , respectivamente, conforme mostrado na figura 12.

Figura 12. Viabilidade celular dos macrófagos J774A.1 após tratamento com os compostos isoliquiritigenina (ISL) ou formononetina (FMT)

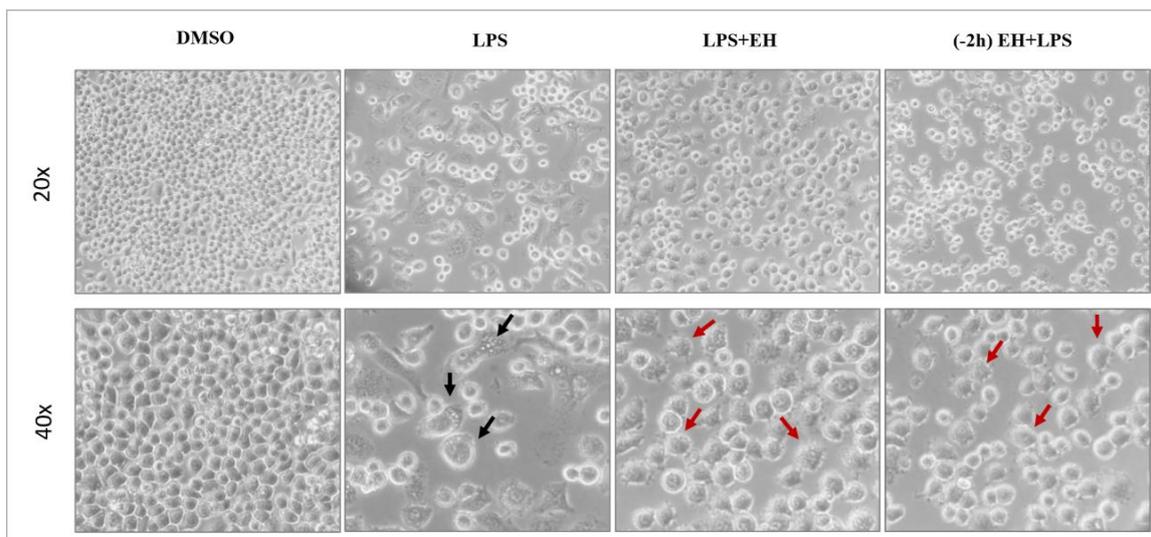


Células J774A.1 tratadas com diferentes concentrações de ISL ou FMT por 48 h. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (**** $p \leq 0,0001$ comparado ao DMSO).

5.2. Ativação e tratamento dos macrófagos com o EH, ISL ou FMT

Para avaliação da ativação das células J774.A1 foi utilizado o estímulo com LPS. Na análise microscópica foi observado que os macrófagos estimulados com LPS apresentaram alterações morfológicas evidentes caracterizadas pelo aumento visível do citoplasma e presença de prolongamentos denominados pseudópodes, quando comparado ao controle não estimulado (DMSO) (Figura 13). Além disso, as células tratadas com o EH da PVA, nas diferentes condições experimentais, apresentaram redução evidente no tamanho celular e nos prolongamentos quando comparado com as células não tratadas estimuladas com LPS, conforme mostrado na figura 13.

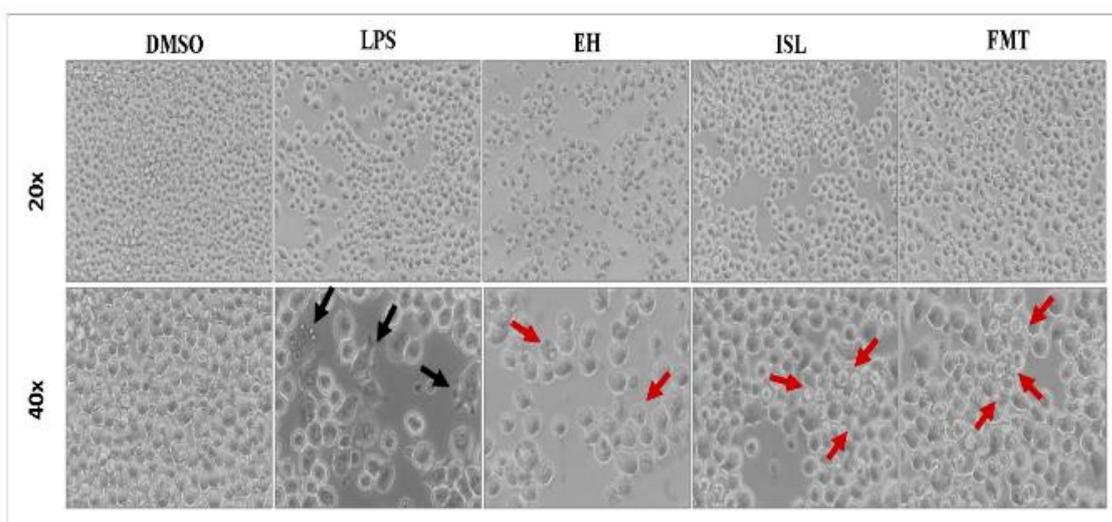
Figura 13. Alterações morfológicas de células J774A.1 estimuladas com LPS e tratadas com o EH da PVA



Micrografias das diferentes condições experimentais. As células J774A.1 foram estimuladas com LPS e tratadas com 50 μ g/mL do EH (LPS + EH) ou tratadas com o EH 2h antes de serem ativadas com LPS [(-2h) EH + LPS] e comparadas com o controle negativo (DMSO) e células estimuladas com LPS não tratadas (LPS). Setas pretas, indicam a presença de pseudópodes, vacúolos fagocitários e aumento do tamanho dos macrófagos estimulados com LPS. Setas vermelhas, indicam a diminuição das características morfológicas de ativação, após o tratamento com o EH nas condições testadas. Fonte: Autor, 2022.

Na análise microscópica dos macrófagos tratados com os compostos ISL (25 μ M) ou FMT (25 μ M) foi possível observar uma discreta diminuição das características morfológicas de ativação celular quando comparado com o controle não tratado estimulado com LPS (Figura 14).

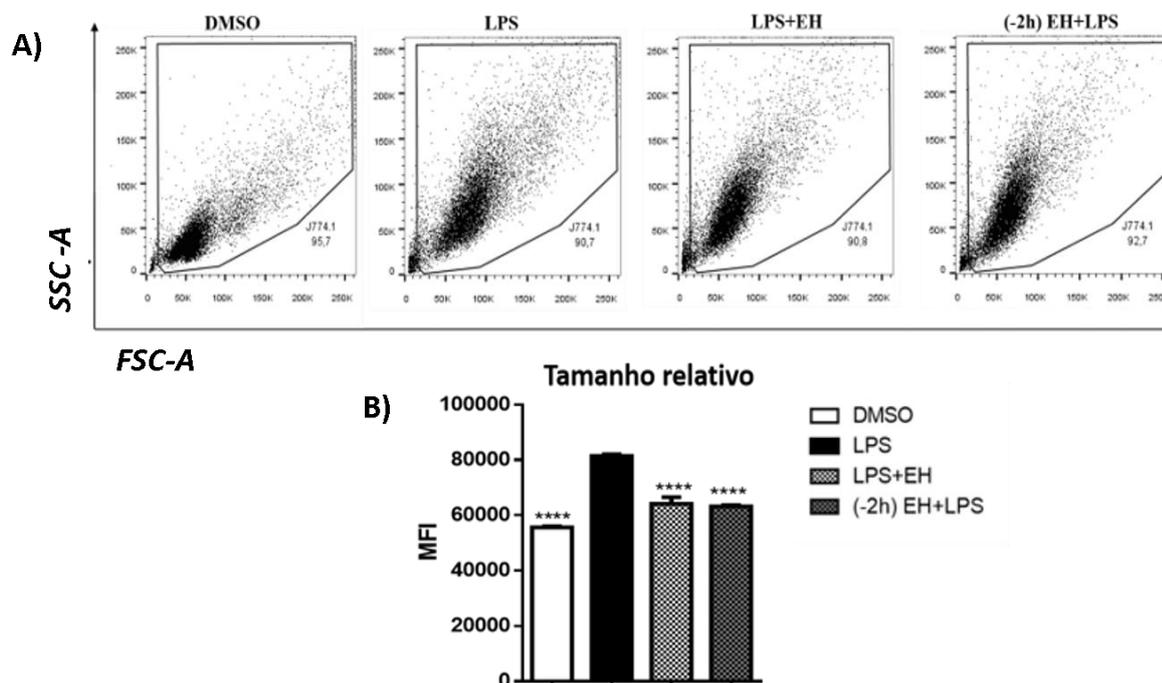
Figura 14. O efeito dos compostos ISL e FMT na morfologia celular.



Micrografias das diferentes condições experimentais. As células J774A.1 foram estimuladas com o LPS e tratadas com EH, ISL ou FMT e comparados com controle negativo (DMSO) e células estimuladas com LPS não tratadas (LPS). Setas pretas, indicam a presença de pseudópodes, vacúolos fagocitários e aumento do tamanho dos macrófagos estimulados com LPS. Setas vermelhas, indicam a diminuição das características morfológicas de ativação após o tratamento com nas condições testadas. Fonte: Autor, 2022.

As alterações morfológicas observadas por microscopia óptica foram confirmadas por citometria de fluxo através da análise do tamanho relativo (FSC) e complexidade celular relativa (SSC). Conforme mostrado na Figura 15, verificou-se um aumento significativo no tamanho relativo das células estimuladas com LPS, comparado as células não-estimuladas (DMSO). Além disso, uma redução significativa no tamanho relativo (FSC) foi detectada nas células estimuladas com LPS e tratadas com o EH nos tempos de -2 e 0h (LPS + EH).

Figura 15. Análise do tamanho e complexidade celular de macrófagos J774A.1 estimuladas com LPS após tratamento com EH da PVA

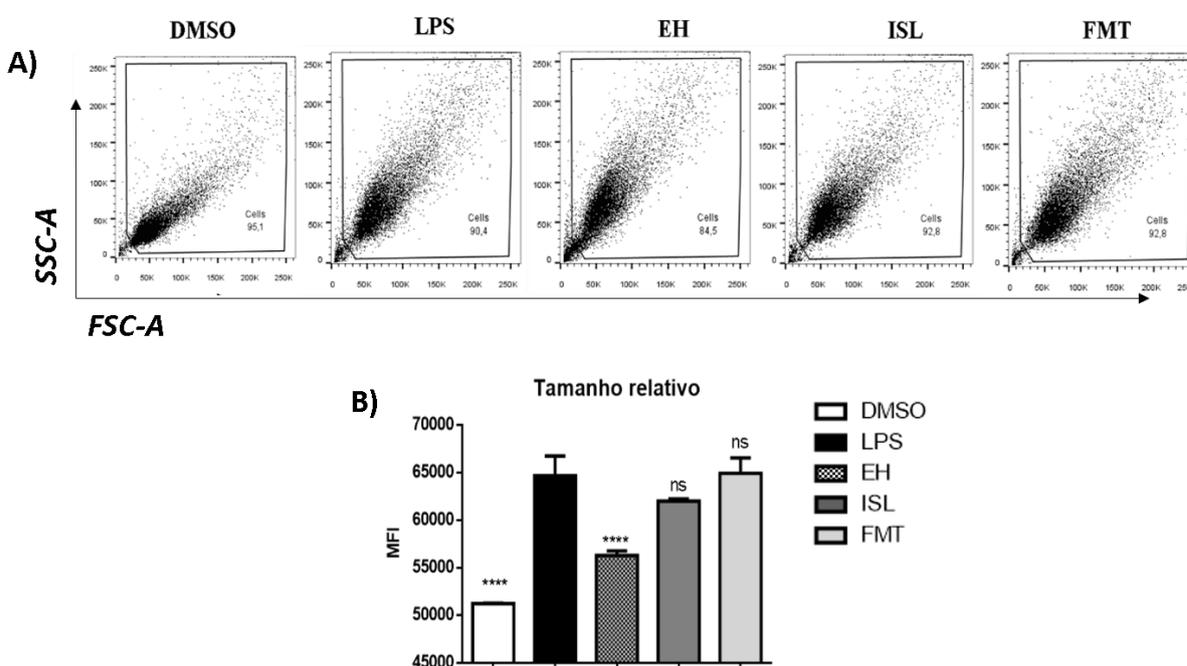


Avaliação por citometria de fluxo do tamanho relativo de células J774 A.1 estimuladas com LPS e tratadas com o EH da PVA. A) Dot plots representativos da dispersão frontal (FSC- Forward Scatter) e dispersão lateral (SSC-Side Scatter) compreendendo tamanho relativo e complexidade relativa, respectivamente. B) Análise da média das MFIs do tamanho relativo (FSC) das condições

experimentais testadas. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA por múltiplas comparações (**** $p \leq 0.0001$ comparado ao LPS).

Conforme mostrado na figura 16, o tratamento com os compostos ISL (25 μM) ou FMT (25 μM) não reduziu significativamente o tamanho relativo (FSC) dos macrófagos em comparação com o controle estimulado com LPS não tratado (LPS).

Figura 16. O efeito da ISL e FMT no tamanho relativo dos macrófagos J774.1.



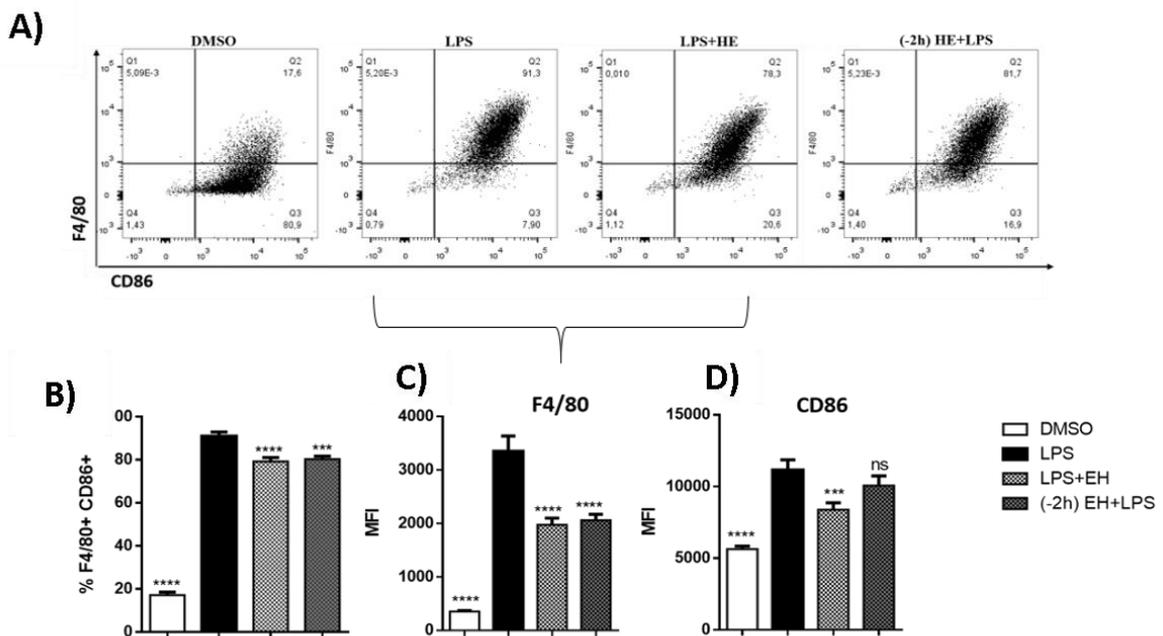
Avaliação por citometria de fluxo do tamanho relativo (FSC) nos macrófagos ativados por LPS e tratados com ISL ou FMT. A) *Dot plots* representativos da dispersão frontal (FSC- Forward Scatter) e dispersão lateral (SSC- Side Scatter) compreendendo o tamanho relativo e complexidade/granulosidade celular, respectivamente. B) Média das MFIs de FSC das condições experimentais testadas. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (**** $p \leq 0.0001$ comparado ao LPS; ns: não significativo).

5.3. Análise da expressão dos marcadores F4/80 e CD86 em macrófagos J774A.1

Para verificar a ativação dos macrófagos estimulados com LPS e após o tratamento com a PVA, ISL ou FMT, a porcentagem de células duplo-positivas (F4/80+ e CD86+) foi avaliada citometria de fluxo. No controle celular sem estímulo com LPS

(DMSO) 17,6% das células expressaram essas moléculas, e quando ativadas com LPS, 91,3% das células mostraram-se F4/80+ CD86+. O tratamento com o EH da PVA reduziu a porcentagem de células duplo-positivas para 78,3% (LPS+EH) e 81,7% (-2h EH+LPS) conforme mostrado na figura 17. Além disso, a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) para a expressão de F4/80 também diminuiu significativamente nos macrófagos tratados com EH adicionado no tempo 0h (LPS+EH) e -2h comparado as células não-tratadas (LPS) (Figura 17C). No entanto, foi detectada uma redução da expressão da molécula co-estimuladora CD86, um marcador fenotípico de ativação de macrófagos, somente no tratamento com o EH adicionado no tempo 0h (Figura 17D).

Figura 17. Expressão de marcadores F4/80 e CD86 em macrófagos J774A.1 ativados com LPS e tratados com o EH da PVA.



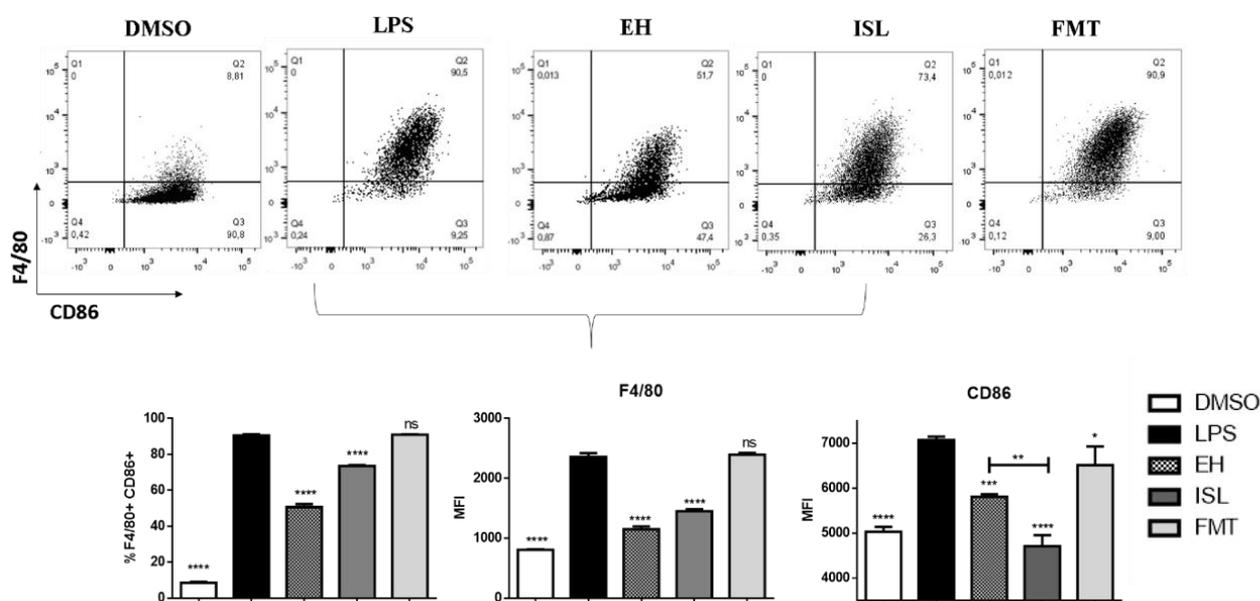
Dot plots representativos (A), gráficos de porcentagem (B) de células duplo positivas (F4/80+ CD86+) e expressão (MFI) dos marcadores F4/80 (C) e CD86 (D) avaliados na população de células duplo-positivas nas condições experimentais testadas. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (**** $p \leq 0.0001$ e *** $p \leq 0.001$ comparado ao LPS; ns = não significativo).

A porcentagem de células duplo positivas (CD86+ e F4/80+) também foi avaliada no tratamento com os compostos ISL ou FMT isoladamente. No controle negativo (DMSO) 8,81% das células expressaram essas moléculas e após estímulo com LPS, 90,5% apresentaram-se duplo-positivas, indicando assim a ativação celular (Figura 18A e

18B). No tratamento com o EH da PVA ou com ISL observou-se uma redução de células F4/80+ CD86+ para 51,7% e 73,4%, respectivamente. Por outro lado, nas células tratadas com FMT não houve redução significativa na porcentagem de células duplo positivas (Figura 18A e 18B).

Avaliando a expressão desses marcadores separadamente nos macrófagos duplo positivos (F4/80+ CD86+), foi possível observar que a expressão (MFI) de F4/80 diminuiu significativamente após o tratamento com o EH da PVA e com a ISL, no entanto, o mesmo efeito não foi observado para FMT (Figura 18C). Entretanto, uma redução significativa da expressão (MFI) de CD86, um marcador de ativação de macrófagos murinos, foi detectada após o tratamento com EH, ISL ou FMT, embora uma redução mais discreta tenha sido observada para a FMT (Figura 18C). Ainda, uma maior redução da MFI de CD86 foi detectada para ISL quando comparada ao tratamento com o EH da PVA (Figura 18D).

Figura 18. Análise da expressão de F4/80 e CD86 em macrófagos J774.A1 ativados com LPS e tratados com ISL.



Dot plots representativos (A), gráficos de porcentagem de células duplo positivas (F4/80+ CD86+) (B) e expressão (MFI) dos marcadores F4/80 e CD86 na população de células duplo positivas, nas condições experimentais testadas. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (**** $p \leq 0.0001$ e *** $p \leq 0.001$ comparado ao LPS) e teste t-student (** $p \leq 0.01$ comparado ao EH; ns = não significativo).

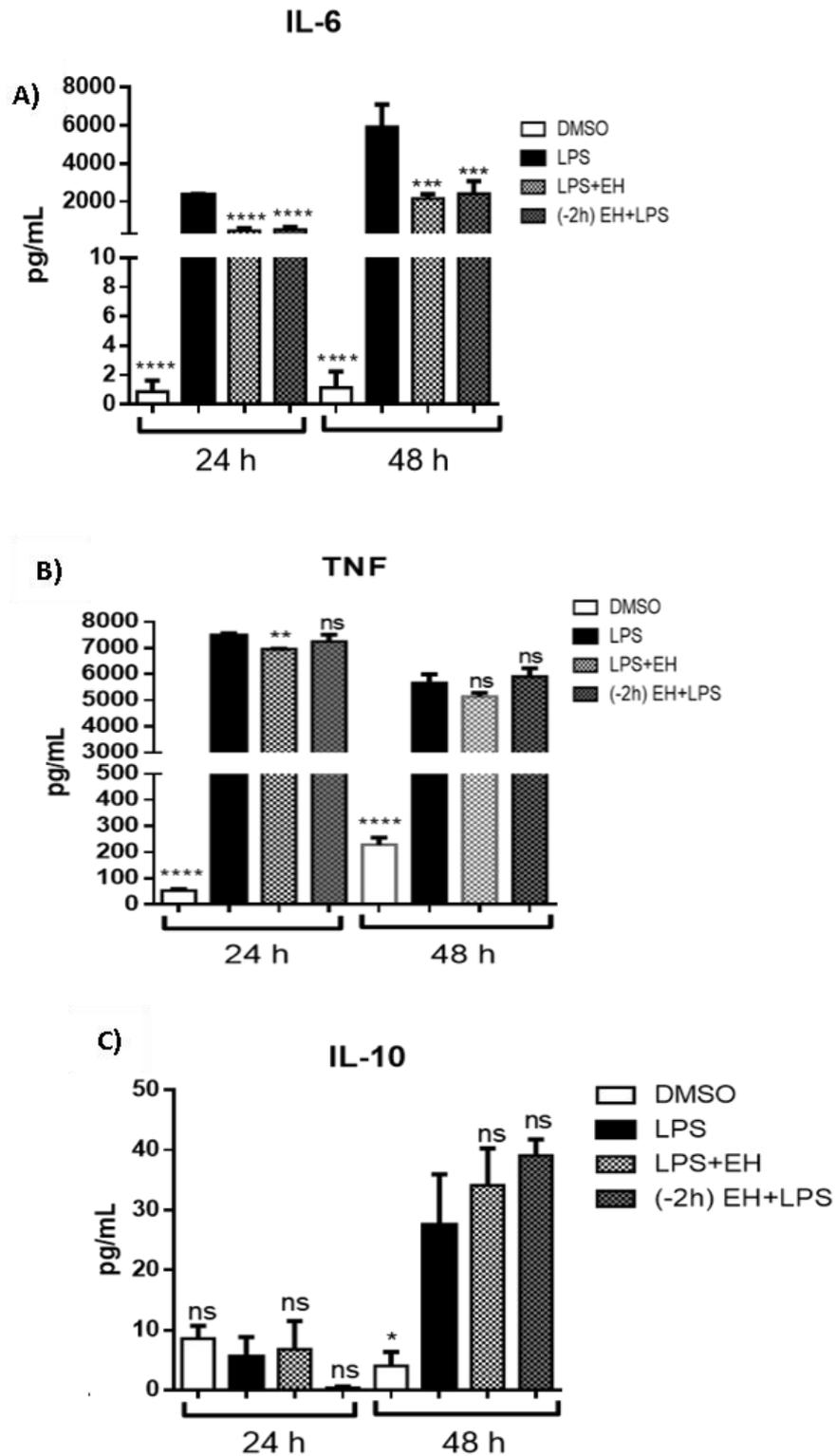
5.4. Quantificação de citocinas no sobrenadante

A secreção das citocinas IL-6, TNF e IL-10 foi avaliada 24 e 48h após o tratamento por meio da metodologia de CBA. O estímulo com LPS induziu um aumento significativo nos níveis de IL-6 e o tratamento com o EH da PVA reduziu significativamente os níveis desta citocina após 24 e 48h (Figura 19A).

Os níveis da citocina TNF também aumentaram após 24h e 48h do estímulo com LPS. Além disso, uma redução significativa dessa citocina pro-inflamatória foi detectada somente 24h após o tratamento com o EH da PVA (Figura 19B).

Em relação a citocina IL-10 não foi observado alterações significativas após 24h (Figura 19C). Após 48h, um aumento de IL-10 foi detectado após o estímulo com LPS e o tratamento com o EH da PVA não levou a alterações estatisticamente significativas nos níveis desta citocina (Figura 19C).

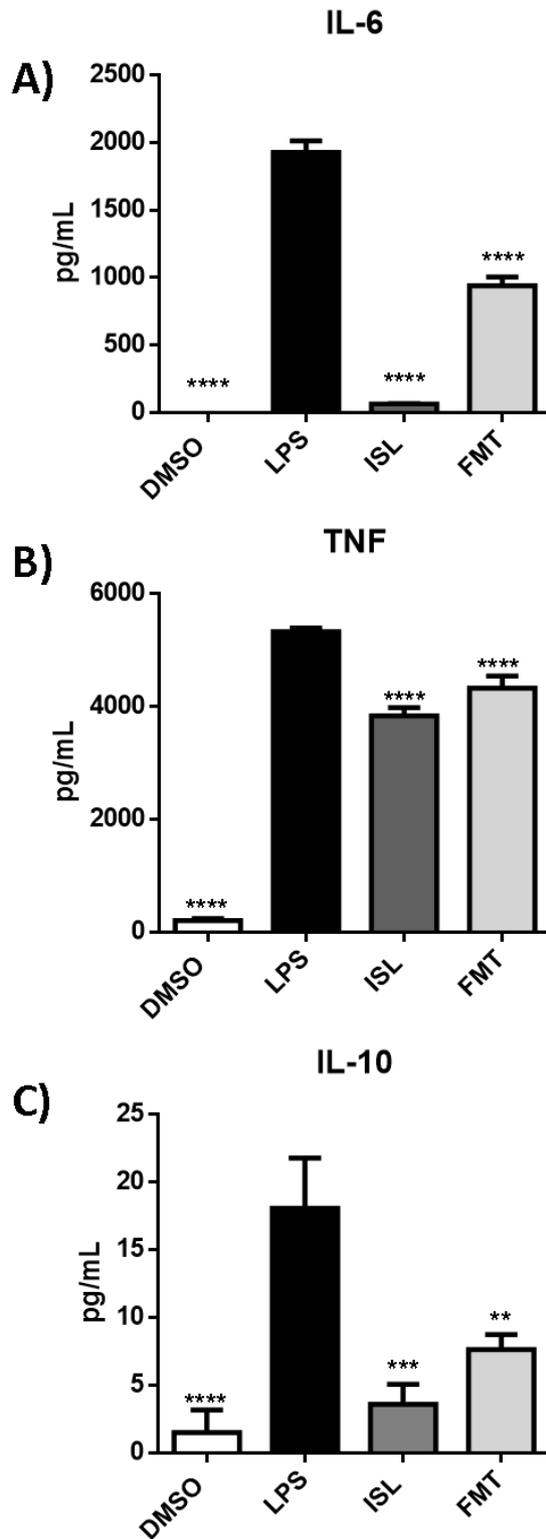
Figura 19. Quantificação de citocinas no sobrenadante de macrófagos J774A.1 estimulados com LPS após o tratamento com EH da PVA



Concentração de citocinas (pg/mL) no sobrenadante de macrófagos J774A.1. As citocinas IL-6, TNF e IL-10 foram quantificadas no sobrenadante dos macrófagos nas condições experimentais testadas. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (**** $p \leq 0.0001$ e ** $p \leq 0.01$ comparado ao LPS; ns = não significante).

A secreção de citocinas também foi avaliada após 48h de tratamento com os compostos ISL ou FMT. Foi possível detectar uma redução significativa nos níveis de IL-6 (Figura 20A), TNF (Figura 20B) e IL-10 (Figura 20C) após o tratamento com a ISL ou FMT.

Figura 20. Quantificação de citocinas no sobrenadante de macrófagos J774A.1 estimulados com LPS após o tratamento com EH da PVA, ISL e FMT



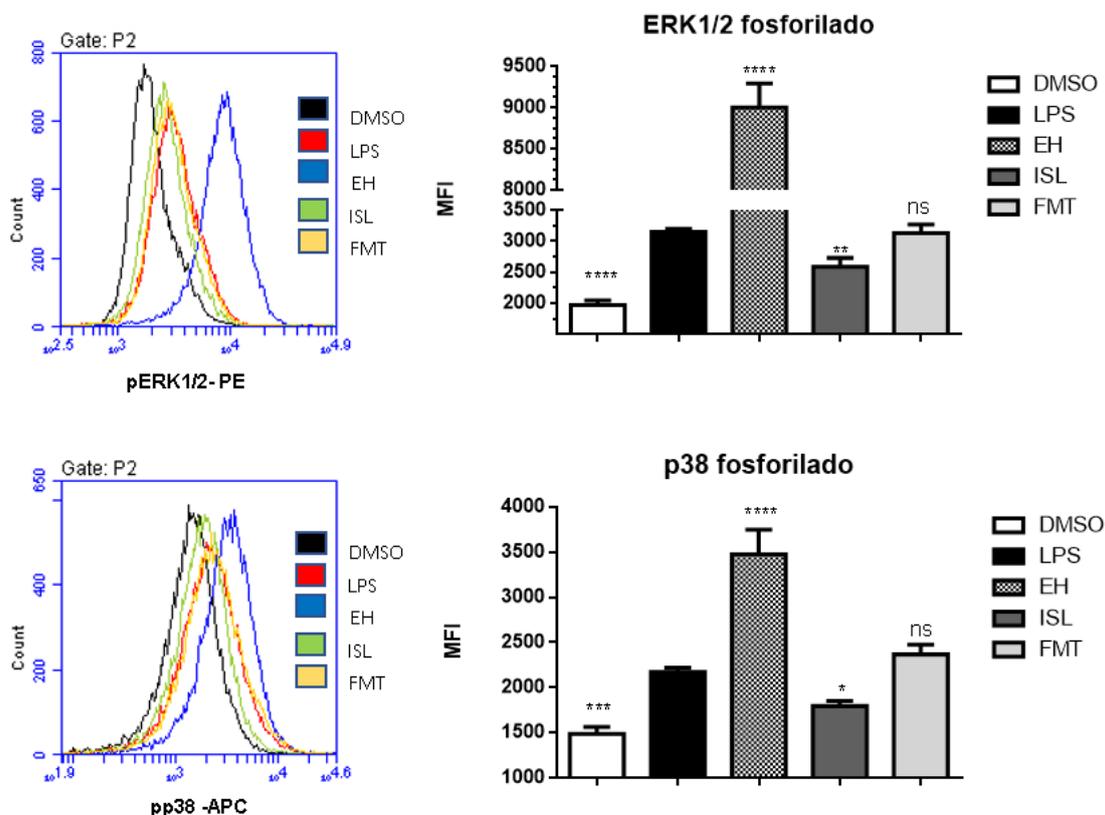
Concentração de citocinas (pg/mL) no sobrenadante de macrófagos J774A.1. As citocinas IL-6, TNF e IL-10 foram quantificadas no sobrenadante dos macrófagos nas condições experimentais testadas. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA (**** $p \leq 0.0001$ e ** $p \leq 0.01$ comparado ao LPS).

5.6. Análise da ativação das vias de MAPKs

A análise da ativação de MAPKs foi avaliada por meio da detecção da fosforilação de ERK1/2 e p38 por citometria de fluxo intracelular 48h após o estímulo com LPS e tratamento com o EH da PVA ou com a ISL.

Como resultado, 48h após o estímulo com LPS, foi detectado um aumento na fosforilação de ERK1/2 e p38, mostrando uma ativação destas MAPKs em resposta ao estímulo (Figura 21). Além disso, nas células tratadas com o EH da PVA, observou-se um aumento significativo da fosforilação de todas as MAPKs avaliadas, quando comparado com as células estimuladas com LPS. Por outro lado, o tratamento com ISL diminuiu a fosforilação de ERK1/2 e p38. Já o tratamento com a FMT não reduziu a fosforilação de ERK1/2 e p38, quando comparado ao LPS, conforme mostrado na figura 21.

Figura 21. Análise da fosforilação de ERK1/2 e p38 em macrófagos estimulados com LPS e tratados com EH da PVA, ISL ou FMT.

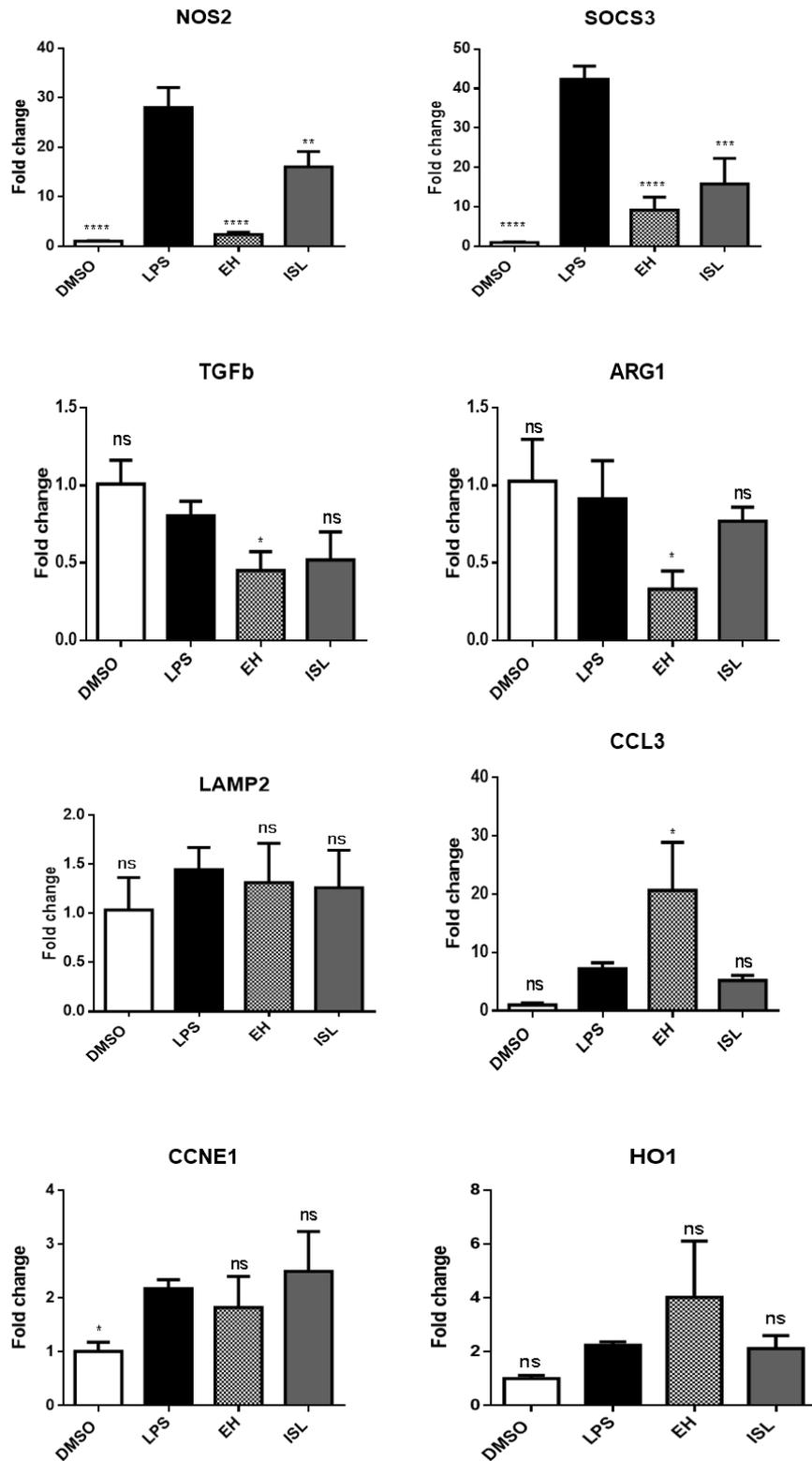


À esquerda, gráficos de sobreposição (histogramas) da análise da fosforilação de ERK1/2 e p38 entre os controles DMSO, LPS, EH e ISL. À direita, gráficos da MFI da fosforilação de ERK1/2 e p38 nas diferentes condições experimentais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA (ns $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ comparado ao LPS; ns = não significativo).

5.7. Modulação da expressão gênica em macrófagos J774A.1 após tratamento com o EH da PVA e ISL

Tendo visto que a o EH e a ISL modularam a fosforilação de ERK1/2 e p38 e reduziram a percentagem de macrófagos F4/80+ CD86+, a expressão gênica dessas células foi avaliada após o tratamento. O estímulo dos macrófagos com o LPS resultou no aumento da expressão dos genes NOS2 e SOCS3 e o tratamento com o EH da PVA ou com a ISL diminuiu a expressão relativa desses genes (Figura 22). Os genes TGF-beta, Arg1 e CCL3 foram modulados negativamente nos macrófagos tratados com o EH da PVA, quando comparado com o controle estimulado com LPS, contudo, o mesmo não foi observado no tratamento com ISL (Figura 22). Não houve modulação na expressão dos genes LAMP2, CCNE1 e HO-1 quando tratados com PVA ou ISL (Figura 22).

Figura 22. Expressão relativa dos genes envolvidos em diferentes processos biológicos nos macrófagos após o tratamento com o EH da PVA ou ISL.



As análises estatísticas foram realizadas pelo teste one-way ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Dunnett (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ e **** $p \leq 0.0001$).

6. DISCUSSÃO

A própolis vermelha é uma substância resinosa que possui diversas propriedades biológicas. Neste estudo, foi avaliada a atividade imunomoduladora do EH da PVA e compostos presentes no EH da PVA isoladamente (ISL ou FMT), em macrófagos murinos estimulados com LPS *in vitro*.

Inicialmente, a concentração máxima não tóxica (CMNT) dos compostos testados em macrófagos J774.A1 foi determinada. Nesse estudo, foi possível observar que a CMNT do EH da PVA foi inferior (50 $\mu\text{g/mL}$) ao obtido em outros estudos, que obtiveram CMNT de 60-70 $\mu\text{g/mL}$ em macrófagos RAW 246.7 (BUENO-SILVA et al., 2015, 2017a). Para a ISL, a CMNT foi de 25 μM para células J774A.1. Um estudo mostrou que a concentração 20 μM não afetou a viabilidade dos macrófagos RAW 64.7 (LEE et al., 2009), em um outro estudo, com macrófagos peritoneais, a concentração de 33,3 μM não se mostrou tóxica para essas células (YANG et al., 2021), corroborando com os resultados desse estudo. Com relação a FMT, 25 μM afetou a viabilidade das células RAW 264.7, sendo utilizado em outros estudos a concentração experimental de 10 μM (KIM et al., 2019b; LEE et al., 2009), enquanto no presente estudo a CMNT de 50 μM foi obtida para células J774A.1. Esses resultados sugerem que a linhagem J774A.1 toleram concentrações de FMT mais altas que as da linhagem RAW264.7. Além disso, a linhagem celular pode ser um dos fatores que influenciou a divergências dos resultados.

As observações sobre a ativação do fenótipo de macrófagos pelo LPS são consistentes com os relatos da literatura, que mostram que células RAW 264.7, uma outra linhagem celular de macrófagos, quando estimuladas, contêm vacúolos citoplasmáticos e numerosas projeções citoplasmáticas (HAAK-FRENDSCHO et al., 2008). A exposição de macrófagos a LPS e IFN- γ induz a ativação de macrófagos, resultando em alterações morfológicas nas células RAW 264.7, que incluem o aparecimento de pseudópodes maiores e as células tornam-se mais granulares e estreladas, com núcleos proeminentes (ZHANG et al., 2009). Neste estudo, foram observadas alterações semelhantes na morfologia de macrófagos da linhagem J774A.1 estimulados com LPS. No entanto, nos macrófagos ativados com LPS e tratados com o EH da PVA, ISL ou FMT, foi possível observar uma diminuição discreta da presença dessas características morfológicas.

A partir dos efeitos observados na morfologia dos macrófagos após a ativação por LPS e tratamento com o EH e os compostos (ISL ou FMT), foram avaliados os marcadores fenotípicos F4/80 e CD86. O F4/80 é uma glicoproteína, considerada um marcador específico para macrófagos murinos (DOS ANJOS CASSADO, 2017) e o CD86 é uma molécula co-estimuladora, também considerado um marcador de macrófagos de perfil M1 (SOLDANO et al., 2018). O EH ou a ISL diminui a ativação dos macrófagos J774.A1 reduzindo a percentagem de células F4/80+ CD86+ após o tratamento. Este resultado é interessante, visto que os macrófagos de perfil M1 murinos, quando ativados passam a expressar esses marcadores (JABLONSKI et al., 2015).

Nossos resultados, indicam que a PVA possui um efeito imunossupressor, visto que a molécula co-estimuladora é importante na promoção da inflamação e é necessária para a ativação dos linfócitos T. O tratamento com a PVA indica possivelmente uma supressão da ativação/polarização para um perfil M1, pois macrófagos M1 em repouso tem uma expressão basal de CD86, mais quando ativados passam a expressar níveis mais altos dessa molécula. Bueno-Silva (2015) mostrou o inverso do observado nesse estudo, embora ele tenha avaliado a expressão do mRNA de CD80/CD86, o tratamento de células RAW 264.7 com a PV aumentou a expressão do mRNA dessas proteínas, indicando a ativação dessas células pela PV (BUENO-SILVA et al., 2015).

A diminuição da expressão de CD86 após o tratamento com a ISL corroborou com achados na literatura, onde foi avaliado também por citometria de fluxo a supressão de CD86 em células da linhagem THP-1 tratadas com ISL, num modelo de dermatite atópica (YU et al., 2017). A ISL é uma chalcona e faz parte da composição química de diversas plantas medicinais e produtos de origem natural (SHARMA; KATIYAR; AGRAWAL, 2018) que apresenta diversas atividades farmacológicas (PENG et al., 2015).

Em relação à produção de citocinas após o tratamento, vale ressaltar que a IL-6 e TNF são citocinas inflamatórias e desempenham um papel crucial no processo inflamatório e são secretadas por diversos tipos celulares, incluindo os macrófagos ativados classicamente (ABBAS; et al. 2015). Elevados níveis dessas citocinas está associado a maior gravidade de doenças inflamatórias (FERNANDO et al., 2014). Por outro lado, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, secretada por macrófagos ativados alternativamente, estando associada ao controle e resolução da inflamação (ABBAS; et al. 2015). Atua suprimindo a ativação do fator de transcrição de NF-κB, que é um dos responsáveis pela transcrição de citocinas e mediadores inflamatórios (BRANDTZAEG

et al., 1996). Assim, foi avaliado o efeito do tratamento do EH, ISL ou FMT na produção de citocinas e foi possível observar que tanto o tratamento com o extrato da PVA como com os compostos isoladamente diminuíram os níveis de IL-6 e TNF, nas condições testadas. De forma interessante, Bueno-Silva (2015) observou que o tratamento de células RAW 264.7 com a PVA aumentou os níveis de IL-6 e TNF, quando comparado com o LPS, e inibiu IL-10 (BUENO-SILVA et al., 2015). Em contrapartida o tratamento destas células com a ISL diminuiu a produção de IL-6 (ZHAO et al., 2014) e TNF (LEE et al., 2009), já a FMT reduziu essas citocinas *in vivo* (MA et al., 2013).

O estímulo do LPS em macrófagos ativa diversas vias de sinalização que culminam na produção de mediadores inflamatórios. Neste estudo, foi avaliada a ativação de diversas proteínas quinases (MAPKs - proteína quinase ativada por mitógenos), que desempenham funções importantes nos processos biológicos de divisão celular, diferenciação, proliferação e apoptose (KAMINSKA, 2005)(CARGNELLO; ROUX, 2012). Para entendermos essa possível modulação do EH da PVA e do composto isolado ISL nos macrófagos ativados por LPS, avaliamos a fosforilação de ERK1/2 e p38 e a expressão de genes relacionados as vias pró-inflamatórias (*NOS2*, *SOCS3*, *CCL3*), anti-inflamatórias (*Arg1*, *TGFβ*), ao estresse oxidativo (*HO1*), ao ciclo celular (*CCNE1*) e relacionado a fagocitose (*LAMP2*).

Em nossos resultados, foi possível detectar a ativação das vias ERK1/2 e p38 nos macrófagos em decorrência do estímulo com LPS, como esperado. Interessantemente, o tratamento dos macrófagos com o EH da PVA potencializou a ativação das vias estudadas e o efeito contrário pôde ser observado com o tratamento da ISL, que reduziu a fosforilação de ERK1/2 e p38 em comparação ao estímulo com LPS. Em um estudo, foi demonstrado que o tratamento de macrófagos RAW 264.7 com o extrato da propólis vermelha diminuiu a ativação das proteínas fosforiladas NF-kB, C-FOS e MAPK p42/p44 (ERK1/2) (BUENO-SILVA et al., 2015). O extrato da PVA é uma mistura complexa com diversos compostos que possuem diferentes atividades biológicas, a depender da época de coleta e sazonalidade, as concentrações e presença dos componentes podem variar (NUNES et al., 2009; SILVA et al., 2008). Possivelmente, em nosso extrato, talvez, os compostos que ativem as vias de sinalização ERK1/2 e p38 estivessem em maiores concentrações, contudo, é necessário realizar um estudo fitoquímico com o extrato utilizado. Além disso, as MAPKs estão envolvidas em diversos processos biológicos e

devido a diversos constituintes presentes no EH diferentes fenômenos biológicos podem estar sendo possivelmente modulados.

A ativação das proteínas MAPK podem estar envolvidas com as respostas antioxidantes. Um estudo mostrou que o tratamento com a procianidina B2, um flavonoide natural, protegeu células Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano) contra o estresse oxidativo induzindo a ativação das proteínas ERKs e p38, ambas envolvidas na translocação de Nrf2 (Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2) para o núcleo celular (RODRÍGUES-RAMIRO et al., 2012). Os flavonoides do cacau induziram a ativação das enzimas antioxidantes, Glutaciona peroxidase (GPx) e Glutaciona redutase (GR) através da ativação de ERK1/2 em células HepG2 (MARTÍN et al., 2010). Em um outro estudo, o tratamento de células Caco-2 com o extrato polifenólico da própolis do álamo também induziu a ativação das vias ERK1/2 e p38 fortalecendo as junções oclusivas da barreira intestinal (WANG et al., 2016). Esses dados sugerem que os flavonoides podem promover a modulação de diferentes respostas através da ativação das proteínas MAPK.

Nos últimos anos, estudos com compostos isolados da própolis vermelha têm sido realizados. Neste contexto, a ação anti-inflamatória dos isoflavonóides neovestitol e vestitol isolados da própolis vermelha foi mostrada através de estudos *in vivo* onde esses compostos inibiram a migração de neutrófilos em camundongos e reduziram os níveis de IL-6 durante o desenvolvimento da inflamação (BUENO-SILVA et al., 2013; FRANCHIN et al., 2016). A atividade anti-inflamatória da ISL também foi mostrada, onde o tratamento de macrófagos RAW 264.7 com o composto após o estímulo com LPS atenuou a ativação do fator de transcrição NF-κB, além de suprimir a fosforilação das MAPK ERK1/2 e p38 (KIM et al., 2008a). Nossos resultados com o tratamento da ISL corroboram com os achados na literatura comprovando sua ação anti-inflamatória/imunomoduladora em linhagens celulares distintas.

As MAPKs ERK 1/2 e p38 MAPK são proteínas transdutoras de sinal responsáveis por respostas biológicas relacionadas à proliferação, desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação celular (PEARSON et al., 2001). A ativação de MAPKs está envolvida na expressão de iNOS e na ativação de NF-κB que conseqüentemente culminam na produção de mediadores inflamatórios tais como as citocinas (TNF, IL-6, IL-1b, IL-8) induzidas por LPS (BADGER et al., 1996; CARTER et al., 1999; NAKANO et al., 1998). Em nossos resultados, o tratamento com o EH da PVA reduziu

significativamente a expressão relativa de *NOS2* e *SOCS3* e interessantemente aumentou a fosforilação das vias MAPK, indicando a ativação das vias estudadas. O tratamento dos macrófagos com a ISL diminuiu a expressão de *NOS2* e *SOCS3* e a fosforilação de ERK1/2 e p38, o que era esperado, visto que a ativação das MAPK está envolvida na expressão de iNOS e SOCS3.

Macrófagos ativados classicamente (M1) expressam altos níveis da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que é considerada um marcador fidedigno para esta população de células (LISI et al., 2017; ORECCHIONI et al., 2019). Além de ser um marcador de macrófagos M1, a iNOS atua promovendo a produção de NO (óxido nítrico) a partir da catalise da L-arginina. O NO possui diversas funções na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, na inflamação promovendo a vasodilatação, e ocasionando a morte de células tumorais (LORSBACH et al., 1993). O supressor de citocinas 3 (SOCS3) possui um papel crucial na polarização de macrófagos M1. Macrófagos ativados classicamente para um perfil pró-inflamatório possuem alta expressão de SOCS3 e essa população de células também expressam iNOS, marcador de M1 (ARNOLD et al., 2014; LIU et al., 2008).

Diferentes compostos presentes nas classes de flavonoides desempenham atividade anti-inflamatória ou imunomodulatória. Em um estudo, a flavonona liquiritigenina, inibiu a ativação do fator de transcrição NF- κ B, suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e impedindo a formação de edema em patas de camundongo (KIM et al., 2008b). Em um modelo experimental de artrite *in vivo* a medicarpina, pertencente a classe dos pterocarpanos, regulou negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-17A), enquanto regulava positivamente a produção de IL-10, prevenindo o agravamento da doença (MANSOORI et al., 2020). Foi mostrado que guttiferonas K exercem um efeito anti-inflamatório em macrófagos infectados por *Micobacterium tuberculosis* evidenciando a diminuição de mediadores inflamatórios incluindo IL-1 β , TNF, IL-6, iNOS e cicloxigenase 2 (COX2), além de suprimir as atividades do inflamassoma NLRP3, de NF- κ B e Akt (ZHANG et al., 2020). A ação anti-inflamatória dos terpenos foi avaliada por meio da supressão da produção de NO e da atividade de NF- κ B *in vitro* (MARQUES et al., 2019).

Assim, neste estudo observou-se que o EH da PVA e a ISL foram capazes de reduzir a ativação, nos macrófagos J774.A1, ocasionada pelo LPS. Além disso, o tratamento com o EH da PVA levou a diminuição na expressão de RNAm de genes pró-

inflamatórios e secreção de citocinas IL-6 e TNF. Assim, faz-se necessário um aprofundamento no estudo com o extrato da PVA para que esses mecanismos moleculares sejam elucidados contribuindo para descoberta de novos agentes terapêuticos em doenças inflamatórias.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível concluir que o EH da PVA possui atividade imunossupressora em macrófagos J774.A1 ativados por LPS, diminuindo a expressão de proteínas e mediadores inflamatórios.

O tratamento com o EH da PVA reduziu os níveis de IL-6 e TNF e levou a diminuição da expressão de *NOS2* e *SOCS3*, indicando uma possível modulação a nível transcricional.

A ISL se mostrou bastante eficiente reduzindo expressão da molécula co-estimuladora CD86. Além disso, o tratamento com este composto reduziu a expressão dos genes *NOS2* e *SOCS3* e a fosforilação de ERK1/2 e p38.

Os resultados do presente estudo mostraram que a PVA é um produto natural que possui uma atividade imunomoduladora promissora em macrófagos murinos *in vitro* estimulados com LPS devido a supressão de moléculas co-estimuladora de ativação CD86, de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF) e a diminuição da expressão de *NOS2* e *SOCS3*. E que, a ISL, um constituinte da PVA possui atividade anti-inflamatória em função da supressão da molécula de ativação (CD86), a redução da ativação de MAPKs e a diminuição da expressão de *NOS2* e *SOCS3*.

Assim, este estudo contribui com a descoberta e elucidação das atividades biológicas da PVA colaborando para o desenvolvimento futuro de novas estratégias terapêuticas para doenças inflamatórias.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2*. Elsevier Editora Ltda, 2015.

AHN, M. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383–1392, 2007.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278–283, 2007.

ALMEIDA, E. C. DE; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 191–212, 2002.

ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. **Journal of leukocyte biology**, v. 72, n. 1, p. 101–6, jul. 2002.

ARA, T. et al. The Biological Efficacy of Natural Products against Acute and Chronic Inflammatory Diseases in the Oral Region. **Medicines**, v. 5, n. 4, p. 122, 13 nov. 2018.

ARAUJO, M. A. R. et al. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 208–219, fev. 2012.

ARDURA, J. A. et al. Targeting Macrophages: Friends or Foes in Disease? **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1255, 23 out. 2019.

ARNOLD, C. E. et al. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function *in vitro* and *in vivo*. **Immunology**, v. 141, n. 1, p. 96–110, jan. 2014.

ARORA, S. et al. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. **Immunobiology**, v. 223, n. 4–5, p. 383–396, abr. 2018.

ARRUDA, M. O. et al. The Hydroalcoholic Extract Obtained from *Mentha piperita* L. Leaves Attenuates Oxidative Stress and Improves Survival in Lipopolysaccharide-Treated Macrophages. **Journal of immunology research**, v. 2017, p. 2078794, 2017.

BADGER, A. M. et al. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 279, n. 3, p. 1453–61, dez. 1996.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3–15, jan. 2000.

BISWAS, S. K. et al. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 11–24, 15 set. 2012.

BISWAS, S. K.; SICA, A.; LEWIS, C. E. Plasticity of Macrophage Function during Tumor Progression: Regulation by Distinct Molecular Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 4, p. 2011–2017, 15 fev. 2008.

- BLOUNT, J. W.; DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 41, n. 5, p. 333–349, nov. 1992.
- BRANDTZAEG, P. et al. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 1, p. 51–60, 1 jul. 1996.
- BUENO-SILVA, B. et al. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546–4550, 15 maio 2013.
- BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144954, 14 dez. 2015.
- BUENO-SILVA, B. et al. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1583–1590, dez. 2016.
- BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 100–107, jul. 2017a.
- BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 440–447, set. 2017b.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, abr. 1998.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 496–496, jun. 2012.
- CARTER, A. B. et al. The p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is Required for NF- κ B-dependent Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 43, p. 30858–30863, out. 1999.
- CHERTOV, O. et al. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. **Immunological Reviews**, v. 177, n. 1, p. 68–78, out. 2000.
- COHN, Z. A.; HIRSCH, J. G. THE INFLUENCE OF PHAGOCYTOSIS ON THE INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF GRANULE-ASSOCIATED COMPONENTS OF POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES. **Journal of Experimental Medicine**, v. 112, n. 6, p. 1015–1022, 1 dez. 1960.
- DA SILVA FROZZA, C. O. et al. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 63, p. 195–204, jan. 2014.
- DAENEN, K. et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, v. 34, n. 6, p. 975–991, 13 jun. 2019.

- DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935–945, 15 ago. 2008.
- DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- DAUGSCH, A. et al. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008a.
- DAUGSCH, A. et al. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008b.
- DE FREITAS, M. C. D. et al. Biological Activities of Red Propolis: A Review. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 3–12, 23 maio 2018.
- DO NASCIMENTO, T. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 246–254, 2018.
- DOS ANJOS CASSADO, A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. **Results and problems in cell differentiation**, v. 62, p. 161–179, 2017.
- EDWARDS, J. P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1298–1307, dez. 2006.
- EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21–35, jul. 2014.
- FERNANDO, M. R. et al. The Pro-Inflammatory Cytokine, Interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94188, 15 abr. 2014.
- FRANCHI, G. C. et al. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- FRANCHIN, M. et al. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36401, 7 dez. 2016.
- FREIRES, I. et al. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7329–7358, 22 abr. 2015.
- FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, mar. 2016.
- FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in Inflammation. **Current Drug Target -Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–286, 1 jun. 2005.

- FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 189–198, 2015.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171–178, jan. 2006.
- GEISSMANN, F. et al. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 5 fev. 2010.
- GINWALA, R. et al. Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, p. 35, 5 fev. 2019.
- GRATCHEV, A. et al. Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein β IG-H3. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, n. 4, p. 386–392, abr. 2001.
- GU, Q.; YANG, H.; SHI, Q. Macrophages and bone inflammation. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 10, p. 86–93, jul. 2017.
- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signalling**, v. 13, n. 2, p. 85–94, fev. 2001.
- GUIDUCCI, C. et al. Redirecting In vivo Elicited Tumor Infiltrating Macrophages and Dendritic Cells towards Tumor Rejection. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3437–3446, 15 abr. 2005.
- GUO, C. et al. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. **Vascular Cell**, v. 5, n. 1, p. 20, 2013.
- HAAK-FRENDSCHO, M. et al. Transforming growth factor- β 1 inhibits activation of macrophage cell line RAW 264.7 for cell killing. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 82, n. 2, p. 404–410, 28 jun. 2008.
- HART, P. et al. Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1222–1225, 1 set. 1989.
- HEGNAUER, R.; J. GPAYER-BARKMEIJER, R. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 3–16, ago. 1993.
- HETTINGER, J. et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. **Nature Immunology**, v. 14, n. 8, p. 821–830, 30 ago. 2013.
- HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 92, 29 dez. 2017.
- HOEFFEL, G. et al. C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 665–678, abr. 2015.
- HOFER, T.; JØRGENSEN, T. Ø.; OLSEN, R. L. Comparison of Food Antioxidants and Iron Chelators in Two Cellular Free Radical Assays: Strong Protection by Luteolin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 33, p. 8402–8410, 20 ago. 2014.

- HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 49–53, fev. 2006.
- INUI, S. et al. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1293–1296, 18 ago. 2014.
- JABBOUR, H. N. et al. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. **REPRODUCTION**, v. 138, n. 6, p. 903–919, dez. 2009.
- JABLONSKI, K. A. et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0145342, 23 dez. 2015.
- JESSEN, H.; MOE, H. The fine structure of macrophages in the enamel organ, with special reference to the microtubular system. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 126, n. 4, p. 466–482, 1972.
- KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1754, n. 1–2, p. 253–262, dez. 2005.
- KIM, H. et al. Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing. **Advanced Science**, v. 6, n. 20, p. 1900513, 27 out. 2019a.
- KIM, J.-Y. et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 584, n. 1, p. 175–184, abr. 2008a.
- KIM, J. H.; KISMALI, G.; GUPTA, S. C. Natural Products for the Prevention and Treatment of Chronic Inflammatory Diseases: Integrating Traditional Medicine into Modern Chronic Diseases Care. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–2, 2018.
- KIM, M.-S. et al. Anti-Inflammatory Effects of Formononetin 7-O-phosphate, a Novel Biorenovation Product, on LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3910, 30 out. 2019b.
- KIM, Y. W. et al. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 1, p. 165–173, maio 2008b.
- KOHYAMA, M. et al. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. **Nature**, v. 457, n. 7227, p. 318–321, 26 jan. 2009.
- KRAUSGRUBER, T. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 231–238, 16 mar. 2011.
- KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312–318, ago. 1996.
- LEE, C.-H.; CHOI, E. Y. Macrophages and Inflammation. **Journal of Rheumatic Diseases**, v. 25, n. 1, p. 11, 2018.
- LEE, S. H. et al. Isoliquiritigenin, from *Dalbergia odorifera*, up-regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages. **Inflammation Research**, v. 58, n. 5, p. 257–262, 24 maio 2009.

- LEHTONEN, A.; MATIKAINEN, S.; JULKUNEN, I. Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 2, p. 794–803, 15 jul. 1997.
- LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434–5440, maio 2008.
- LISI, L. et al. Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. **Neuroscience Letters**, v. 645, p. 106–112, abr. 2017.
- LIU, Y.-C. et al. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 520–529, 2014.
- LIU, Y. et al. Unique Expression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 Is Essential for Classical Macrophage Activation in Rodents In Vitro and In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6270–6278, 1 maio 2008.
- LORSBACH, R. B. et al. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 3, p. 1908–1913, jan. 1993.
- LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447–454, set. 2008.
- MA, Z. et al. Formononetin Inhibited the Inflammation of LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice Associated with Induction of PPAR Gamma Expression. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1560–1566, 2 dez. 2013.
- MACHADO, B. A. S. et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 8 jan. 2016.
- MAHABELESWAR, G. H. et al. The Myeloid Transcription Factor KLF2 Regulates the Host Response to Polymicrobial Infection and Endotoxic Shock. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 715–728, maio 2011.
- MALYSHEV, I. Y.; MANUKHINA, E. B.; MALYSHEV, Y. I. Physiological organization of immune response based on the homeostatic mechanism of matrix reprogramming: Implication in tumor and biotechnology. **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 6, p. 754–765, jun. 2014.
- MANSOORI, M. N. et al. Medicarpin prevents arthritis in post-menopausal conditions by arresting the expansion of TH17 cells and pro-inflammatory cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 82, p. 106299, maio 2020.
- MARASCHIN, M. et al. Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 1, p. 13–23, 22 jan. 2016.
- MARKS JR., S. C. et al. Administration of colony stimulating factor-1 corrects some macrophage, dental, and skeletal defects in an osteopetrotic mutation (toothless, tl) in the

rat. **Bone**, v. 13, n. 1, p. 89–93, 1992.

MARQUES, F. M. et al. In vitro anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 281–289, 19 abr. 2019.

MARTÍN, M. Á. et al. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.21, n. 3, p.196-205, mar. 2010.

MARTINEZ, F. O. et al. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 7303–7311, 15 nov. 2006.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, 3 mar. 2014.

METCHNIKOFF, E. On the Present State of the Question of Immunity in Infectious Diseases. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 30, n. 4, p. 387–398, out. 1989.

MILITÃO, G. C. G. et al. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sciences**, v. 78, n. 20, p. 2409–2417, abr. 2006.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 15 jun. 2000.

MOISE, A. R.; BOBIŞ, O. *Baccharis dracunculifolia* and *Dalbergia ecastophyllum*, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1619, 21 nov. 2020.

MORO-GARCÍA, M. A. et al. Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 1 mar. 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, 1983.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. 1, p. 541–566, 10 fev. 2017.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 14 nov. 2011.

NAITO, M. Macrophage Heterogeneity in Development and Differentiation. **Archives of Histology and Cytology**, v. 56, n. 4, p. 331–351, 1993.

NAKANO, H. et al. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3537–42, 31 mar. 1998.

NEWMAN, A. C.; HUGHES, C. C. W. Macrophages and angiogenesis: a role for Wnt signaling. **Vascular Cell**, v. 4, n. 1, p. 13, 2012.

NEWTON, S. M. et al. The evaluation of forty-three plant species for in vitro

antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 57–67, fev. 2002.

NOVAK, E. M. et al. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 91–102, nov. 2014.

NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, jun. 2009.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477–487, abr. 2008.

ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116–1120, 21 jun. 2007.

ODEGAARD, J. I. et al. Alternative M2 Activation of Kupffer Cells by PPAR δ Ameliorates Obesity-Induced Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 6, p. 496–507, jun. 2008.

OHMORI, Y.; HAMILTON, T. A. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 11, p. 5474–82, 1 dez. 1997.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International immunology**, v. 30, n. 11, p. 511–528, 29 ago. 2018.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v. 77, n. 2, p. 208–213, fev. 2011.

ORECCHIONI, M. et al. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1084, 24 maio 2019.

ORKIN, S. H.; ZON, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 631–644, fev. 2008.

OSTUNI, R. et al. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 229–239, abr. 2015.

PANDA, S. K.; COLONNA, M. Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 861, 7 maio 2019.

PEARSON, G. et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153–183, 1 abr. 2001.

PENG, F. et al. A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 969–977, jul. 2015.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484–6491, jun. 2011.

- PIPPI, B. et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 839–850, abr. 2015.
- PIXLEY, F. J.; STANLEY, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 11, p. 628–638, nov. 2004.
- POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, abr. 2009.
- POMERANTZ, J. L.; BALTIMORE, D. Two pathways to NF-kappaB. **Molecular cell**, v. 10, n. 4, p. 693–5, out. 2002.
- REIS, J. H. DE O. et al. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219063, 5 jul. 2019.
- RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, out. 2011.
- RODRÍGUEZ-RAMIRO, I. et al. Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress. **European journal of nutrition**, v.51, n.7, p. 881-92, 1 out.2012.
- ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 891–928, 1 abr. 2004.
- ROY, P.; SARKAR, U.; BASAK, S. The NF-κB Activating Pathways in Multiple Myeloma. **Biomedicines**, v. 6, n. 2, p. 59, 16 maio 2018.
- RUFATTO, L. C. et al. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591–598, jul. 2017.
- RUSCITTI, P. et al. Advances in immunopathogenesis of macrophage activation syndrome during rheumatic inflammatory diseases: toward new therapeutic targets? **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1041–1047, 2 nov. 2017.
- SAHA, B. et al. Krüppel-like factor 4 is a transcriptional regulator of M1/M2 macrophage polarization in alcoholic liver disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 5, p. 963–973, maio 2015.
- SAMOKHVALOV, I. M. Deconvoluting the ontogeny of hematopoietic stem cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 6, p. 957–978, 25 mar. 2014.
- SCHULZ, C. et al. A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. **Science**, v. 336, n. 6077, p. 86–90, 6 abr. 2012.
- SERBINA, N. V. et al. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 1, p. 421–452, 1 abr. 2008.
- SHARMA, V.; KATIYAR, A.; AGRAWAL, R. C. Glycyrrhiza glabra: Chemistry and Pharmacological Activity. In: **Reference Series in Phytochemistry**. [s.l: s.n.]. p. 87–100.

- SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 5, p. 349–355, out. 2008.
- SICA, A.; BRONTE, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1155–1166, 1 maio 2007.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–795, 1 mar. 2012.
- SILVA, B. B. et al. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2008.
- SIQUEIRA, A. B. S. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 90–96, jan. 2009.
- SIQUEIRA, A. L. et al. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre Enterococcus faecalis. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 6, p. 359–366, dez. 2014.
- SOLDANO, S. et al. Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 77, n. 12, p. 1842–1845, dez. 2018.
- SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–1073, nov. 2009.
- STRAUSS, R. R. Association of some metabolic activities of leukocytes with the immune response. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 121, n. A, p. 3–19, 1979.
- SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. Properties of AdeABC and AdeIJK Efflux Systems of Acinetobacter baumannii Compared with Those of the AcrAB-TolC System of Escherichia coli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7250–7257, dez. 2014.
- TAKAHASHI, K.; YAMAMURA, F.; NAITO, M. Differentiation, Maturation, and Proliferation of Macrophages in the Mouse Yolk Sac: A Light-Microscopic, Enzyme-Cytochemical, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 45, n. 2, p. 87–96, fev. 1989.
- TAN, S. Y. S.; KRASNOW, M. A. Developmental origin of lung macrophage diversity. **Development (Cambridge, England)**, v. 143, n. 8, p. 1318–27, 15 abr. 2016.
- TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 11, p. 897–901, nov. 2003.
- TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249–254, jun. 2006.
- UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 825–852, abr. 2002.
- VAN FURTH, R. et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 6, p. 845–52, 1972.

- VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. **Journal of Experimental Medicine**, v. 128, n. 3, p. 415–435, 1 set. 1968.
- VINOGRADOV, S.; WARREN, G.; WEI, X. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. **Nanomedicine**, v. 9, n. 5, p. 695–707, abr. 2014.
- WAGH, V. D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- WANG, K. et al. Polyphenol-rich propolis extracts strengthen intestinal barrier function by activating AMPK and ERK signaling. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 272. 2016.
- WANG, Q. et al. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. **Cell Research**, v. 20, n. 6, p. 701–712, 13 jun. 2010.
- WANG, R. et al. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1. **Journal of Leukocyte Biology**, 2012.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 15 dez. 2003.
- WHYTE, C. S. et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 5, p. 845–854, nov. 2011.
- WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 24 abr. 2013.
- XIE, Y. et al. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132–149, 26 nov. 2014.
- YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1, 7 dez. 2014.
- YANG, J. et al. Discovery of isoliquiritigenin analogues that reverse acute hepatitis by inhibiting macrophage polarization. **Bioorganic Chemistry**, v. 114, p. 105043, set. 2021.
- YAO, Y.; XU, X.-H.; JIN, L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 15 abr. 2019.
- YONA, S. et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 79–91, jan. 2013.
- YU, H. et al. Effect of isoliquiritigenin for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. **Archives of Dermatological Research**, v. 309, n. 10, p. 805–813, 12 dez. 2017.
- ZHANG, L. et al. Inhibition of Macrophage Activation by the Myxoma Virus M141 Protein (vCD200). **Journal of Virology**, v. 83, n. 18, p. 9602–9607, 15 set. 2009.
- ZHANG, Q. et al. Guttiferone K Exerts the Anti-inflammatory Effect on Mycobacterium Tuberculosis- (H37Ra-) Infected Macrophages by Targeting the TLR/IRAK-1 Mediated Akt and NF- κ B Pathway. **Mediators of inflammation**, v. 2020, p. 8528901, out. 2020.

ZHAO, H. et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 279, n. 3, p. 311–321, set. 2014.

ZIZZO, G. et al. Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 7, p. 3508–3520, 1 out. 2012.

ZULHENDRI, F. et al. Propolis in Metabolic Syndrome and Its Associated Chronic Diseases: A Narrative Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 348, 26 fev. 2021.

9. ANEXOS

9.1. Artigos publicados durante o desenvolvimento do mestrado



Pharmaceuticals (Basel). 2020 Jul; 13(7): 141.
Published online 2020 Jun 30. doi: [10.3390/ph13070141](https://doi.org/10.3390/ph13070141)

PMCID: [PMC7407227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7407227/)
PMID: [32629969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32629969/)

Computer-Aided Design, Synthesis, and Antiviral Evaluation of Novel Acrylamides as Potential Inhibitors of E3-E2-E1 Glycoproteins Complex from Chikungunya Virus

[Gabriel Felipe Silva Passos](#),¹ [Matheus Gabriel Moura Gomes](#),¹ [Thiago Mendonça de Aquino](#),² [João Xavier de Araújo-Júnior](#),¹ [Stephannie Janaina Maia de Souza](#),³ [João Pedro Monteiro Cavalcante](#),³ [Elane Conceição dos Santos](#),³ [Ênio José Bassi](#),³ and [Edeildo Ferreira da Silva-Júnior](#)^{1,2,*}

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ► [Disclaimer](#)

Original Article | [Published: 25 October 2021](#)

LASSBio-596: a New Pre-clinical Candidate for Rheumatoid Arthritis?

[Max Denisson Maurício Viana](#) ✉, [Alyne Almeida de Lima](#), [Geraldo José da Silva Neto](#), [Suellen Maria Albuquerque da Silva](#), [Anderson Brandão Leite](#), [Elane Conceição dos Santos](#), [Ênio José Bassi](#), [Eliane Aparecida Campesatto](#), [Aline Cavalcanti de Queiroz](#), [Eliezer Jesus Barreiro](#), [Lidia Moreira Lima](#) & [Magna Suzana Alexandre-Moreira](#)

Inflammation (2021) | [Cite this article](#)

164 Accesses | [Metrics](#)

Abstract

Pain and inflammatory disorders are significant health problems because of prevalence and associated disabilities. In this context, LASSBio-596 is a hybrid compound able to modulate TNF- α and phosphodiesterases 4 and 5, exhibiting an anti-inflammatory effect in the pulmonary inflammatory model. Aiming at a better description of the activities of LASSBio-596, we initially conducted nociception tests (acetic acid-induced abdominal writhing, glutamate, and formalin-induced nociception and hot plate test) and later inflammatory tests (acute, peritonitis; and chronic, arthritis) that directed us to this last one. In the abdominal writhing test, there was a dose-dependent inhibition, whose response occurred at the maximum dose (50 mg/kg, p.o.), used in the subsequent tests. LASSBio-596 also inhibited nociception induced by chemical (glutamate by 31.9%; and formalin, in both phases, 1st phase: 25.7%; 2nd phase: 23.9%) and thermal agents (hotplate, by increased latency for pain at two different times). These effects were independent of the motor function, legitimated in rotarod. As there was a response in the inflammatory component of nociception, we performed the peritonitis test, in which migration was inhibited by LASSBio-596 by 39.9%. As the inflammatory process is present in autoimmune diseases, we also performed the arthritis test. LASSBio-596 reduced paw edema from the 15th day to the 21st day of treatment (no liver changes and with fewer paw injuries). In addition, LASSBio-596 decreased serum levels of TNF- α by 67.1%. These data demonstrated the antinociceptive effect of LASSBio-596 and reinforces its anti-inflammatory property (i.e., RA), amplifying the therapeutic potential of this molecule.

9.2. Capítulo de livro publicado durante o desenvolvimento do mestrado



[Human Viruses: Diseases, Treatments and Vaccines](#) pp 233-295 | [Cite as](#)

The Medicinal Chemistry of Zika Virus

Authors [Authors and affiliations](#)

Érica Erlanny da Silva Rodrigues, Hannah Maus, Stefan Josef Hammerschmidt, Alessia Ruggieri, Elane Conceição dos Santos, Ênio José Bassi, Leticia Anderson, Pedro Gregório Vieira Aquino, João Xavier de Araújo-Júnior, Fenju Wei, Xinyong Liu, Peng Zhan, Tanja Schirmeister, Edeildo Ferreira da Silva-Júnior 

Chapter
First Online: 20 May 2021

[1](#) Citations [342](#) Downloads

Abstract

Arthropod-borne viruses, also known as arboviruses, are transmitted by bites of infected mosquito or tick vectors. In this context, the *Flavivirus* genus is mainly transmitted by mosquitoes from the *Aedes* genus, being the *Ae. africanus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. Albopictus* species are responsible for transmitting the Zika virus (ZIKV). It is a lipid-enveloped virus constitute of an RNA genome, which is translated into a polyprotein encoding three structural proteins {(capsid (C), membrane (M), and envelope (E))} and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). Several biological targets have been identified for developing antiviral agents against ZIKV, which could prevent virus entry, assembly, or release of new virion particles, by interactions with structural proteins. Drugs targeting non-structural proteins could inhibit the ZIKV-replication cycle. Nature has provided excellent compounds for designing new potent analogs. The medicinal chemistry emerges as an impressive, rationally design and to develop new antiviral agents. Additionally, virtual and high-throughput screenings have contributed greatly to the identification of previously approved-drugs that could be repurposed for ZIKV, as antiviral agents. In this chapter, we offer a literature review about the most relevant and recent advances made on the medicinal chemistry of ZIKV research. We focus on natural, nature-based, semi-synthetic, and synthetic antiviral compounds, as well as repurposed drugs and other inhibitors targeting ZIKV.

Keywords

Zika virus Natural compounds Nature-based Synthetic compounds Drug repurposing
Virtual screening Antivirals Medicinal chemistry

9.3. Publicação de resumo em anais de eventos científicos

Título do Trabalho

ANTIVIRAL ACTIVITY OF BIOCHANIN A AGAINST CHIKUNGUNYA VIRUS IN HUMAN FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES IN VITRO

Autores

- Grazielle Lobo Coelho
- Stephannie Janaina Maia De Souza
- Elane Conceição dos Santos
- Káthia Duarte Galvão
- Julia de Andrade Brandão
- Jamile Taniele da Silva
- Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
- Leticia Anderson Bassi
- Dr. Ênio José Bassi

Modalidade

Resumo

Área Temática

Básica

Data de Publicação

04/11/2021

Pais da Publicação

Brasil

Idioma da Publicação

Português

Página do Trabalho

www.even3.com.br/Anais/cbv2021/411036-ANTIVIRAL-ACTIVITY-OF-BIOCHANIN-A-AGAINST-CHIKUNGUNYA-VIRUS-IN-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-IN-VITRO

ISBN

978-65-5941-393-5

Título do Evento

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa

Título dos Anais do Evento

Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa

Nome da Editora

Even3

Meio de Divulgação

Meio Digital

DOI

[Obter o DOI](#)

Como citar

COELHO, Grazielle Lobo et al.. ANTIVIRAL ACTIVITY OF BIOCHANIN A AGAINST CHIKUNGUNYA VIRUS IN HUMAN FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES IN VITRO.. In: Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa. Anais...Belo Horizonte(MG) Online, 2021. Disponível em: <<https://www.even3.com.br/anais/cbv2021/411036-ANTIVIRAL-ACTIVITY-OF-BIOCHANIN-A-AGAINST-CHIKUNGUNYA-VIRUS-IN-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-IN-VITRO>>. Acesso em: 16/11/2021 23:56

Título do Trabalho

CHIKUNGUNYA VIRUS MODULATES CELL SIGNALING PATHWAYS IN INFECTED HUMAN FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES (HFSL) "IN VITRO"

Autores

- Káthia Duarte Galvão
- Jamile Taniele da Silva
- Elane Conceição dos Santos
- Grazielle Lobo Coelho
- Stephannie Janaina Maia De Souza
- Julia de Andrade Brandão
- João Pedro Monteiro Cavalcante
- LETICIA ANDERSON
- Dr. Ênio José Bassi

Modalidade

Resumo

Área Temática

Básica

Data de Publicação

04/11/2021

Pais da Publicação

Brasil

Idioma da Publicação

Português

Página do Trabalho

www.even3.com.br/Anais/cbv2021/411337-CHIKUNGUNYA-VIRUS-MODULATES-CELL-SIGNALING-PATHWAYS-IN-INFECTED-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-(HFSL)-IN-VIT

ISBN

978-65-5941-393-5

Título do Evento

XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa

Título dos Anais do Evento

Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa

Nome da Editora

Even3

Meio de Divulgação

Meio Digital

DOI

[Obter o DOI](#)

Como citar

GALVÃO, Káthia Duarte et al.. CHIKUNGUNYA VIRUS MODULATES CELL SIGNALING PATHWAYS IN INFECTED HUMAN FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES (HFSL) "IN VITRO".. In: Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa. Anais...Belo Horizonte(MG) Online, 2021. Disponível em: <[https://www.even3.com.br/anais/cbv2021/411337-CHIKUNGUNYA-VIRUS-MODULATES-CELL-SIGNALING-PATHWAYS-IN-INFECTED-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-\(HFSL\)-IN-VIT](https://www.even3.com.br/anais/cbv2021/411337-CHIKUNGUNYA-VIRUS-MODULATES-CELL-SIGNALING-PATHWAYS-IN-INFECTED-HUMAN-FIBROBLAST-LIKE-SYNOVIOCYTES-(HFSL)-IN-VIT)>. Acesso em: 17/11/2021 00:02

9.4. Premiação em evento científico

