

**Ação imunomoduladora do santin isolado da própolis
produzida na caatinga nordestina em monócitos humanos**

Pedro Nastaro

Botucatu-SP 2024

**Ação imunomoduladora do santin isolado da própolis
produzida na caatinga nordestina em monócitos humanos**

Pedro Nastaro

Orientador: Prof. Titular José Maurício Sforcin

Trabalho apresentado como pré-requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas pelo Instituto de
Biociências, UNESP, Campus de Botucatu.

Botucatu-SP 2024

N269a

Nastaro, Pedro

Ação imunomoduladora do santin isolado da própolis produzida na caatinga nordestina em monócitos humanos / Pedro Nastaro. -Botucatu, 2024

27 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: José Maurício Sforcin

1. Imunomodulação. 2. Inflamação. 3. Cultura celular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

PEDRO NASTARO

**AÇÃO IMUNOMODULADORA DO SANTIN ISOLADO DA PRÓPOLIS
DA CAATINGA NORDESTINA EM MONÓCITOS**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado à Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel, do curso de
Graduação em Ciências Biológicas.

Local, 03 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Titular José Maurício Sforcin
Instituto de Biociências de Botucatu

Prof^a. Dr^a. Gislane Lelis Vilela de Oliveira
Instituto de Biociências - UNESP

Dedico este trabalho.....

Especialmente ao meu irmãozinho Jonas, por seu amor puro, inocente e genuíno que ele tem por mim.

Aos meus pais e irmãos que desde sempre me apoiaram incondicionalmente em tudo desde o início do meu processo educativo, seja nas pequenas, seja nas grandes coisas.

Aos meus amigos, que tornaram esse processo mais tranquilo de ser passado e superado, com a alegria, humor e o companheirismo que sempre me ofertaram de bom grado.

A todos eles eu dedico:

“Amar verdadeiramente uma pessoa é aceitar que a dedicação de amá-la, vale a dor de perdê-la.” - A Maldição da Mansão Bly

Aos meus professores da educação básica, que reconheceram em mim minha inclinação ao estudo em biologia e na ciência e a partir disso, me incentivaram a permanecer nos estudos e mostrar a valorização e responsabilidade necessárias para ser um pesquisador e estudante de uma universidade pública no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meu orientador, [José Mauricio Sforcin](#), por ter me aceito como seu aluno, pela confiança em meu trabalho, pela atenção, responsabilidade, orientação, exemplo e acima de tudo pelo respeito a mim.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, à Mariana, ao Arthur e à Emily, por toda orientação e ajuda nos ensaios e na rotina do laboratório, ao Jônatas e ao Yuri, pelo companheirismo e por estarem sempre dispostos a me ajudar no andamento do projeto, e a todos eles principalmente pela boa amizade.

Agradeço às Vanessa e Mariana, pesquisadoras do laboratório de Imunologia da Reprodução, por todo auxílio nos ensaios e análises da citometria, além de claro pela simpatia e bom humor que sempre apresentaram.

Agradeço às técnicas do Setor de Microbiologia e Imunologia, ambas pelo companheirismo e amizade, Larissa pelos cafés e por toda paciência em me explicar sobre a citometria de fluxo, à Aline, por todo o acolhimento quando entrei no Departamento de Ciências Químicas e Biológicas e orientação nos procedimentos básicos do departamento e biossegurança.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por terem fomentado e apoiado financeiramente o andamento desse projeto.

Agradeço ao Setor de Microbiologia e Imunologia, corpo docente, corpo técnico-administrativo, pelo espaço cedido e materiais ofertados.

RESUMO

A própolis tem despertado o interesse dos pesquisadores devido ao seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Este produto apícola apresenta composição química variável de acordo com as fontes vegetais utilizadas pelas abelhas. Os compostos descritos nas amostras de própolis apresentaram efeitos terapêuticos em modelos *in vitro* e *in vivo*. Neste trabalho, investigamos o composto isolado santin de uma recém-descoberta amostra de própolis produzida a partir de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., popularmente conhecida como “jurema-preta”, na caatinga nordestina. Foram avaliadas a viabilidade de monócitos humanos após incubação com o santin e a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias ou relacionadas ao inflamassoma (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-33) em condições basais ou após estímulo por LPS, a fim de simular um estado inflamatório. Foram avaliados também metabólitos do ácido araquidônico (PGE2 e LTB4), a ação bactericida dos monócitos, a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e a expressão de marcadores de superfície (TLR2, TLR4, CD62L, CD80 e HLA-DR) por citometria de fluxo. Os dados indicam que o santin possui um perfil ativador, influenciando a atividade de populações de monócitos purificados a partir de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e estimulando a atividade bactericida, a qual foi devida provavelmente ao aumento na produção de EROs.

SUMÁRIO

Introdução.....	8
Metodologia.....	10
Obtenção de monócitos humanos e condições experimentais.....	10
Avaliação da viabilidade celular por MTT.....	11
Determinação de citocinas pela técnica de ELISA.....	11
Determinação de prostaglandina E2 e leucotrieno B4.....	12
Expressão de marcadores de superfície celular.....	12
Atividade bactericida de monócitos.....	13
Produção de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA.....	13
Análise estatística.....	14
Resultados.....	14
Viabilidade celular.....	14
Produção de citocinas em condições basais pelos monócitos.....	15
Produção de citocinas pelos monócitos estimulados por LPS.....	16
Produção de eicosanoides.....	18
Expressão de marcadores de superfície celular e grau de pureza por microbeads.....	19
Avaliação da atividade bactericida de monócitos.....	21
Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	21
Discussão.....	23
Conclusão.....	25
Referências bibliográficas.....	26

Introdução

A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas a partir de materiais coletados em brotos de árvores, seivas, resinas, mucilagens e outras fontes vegetais (ZABAIU et al., 2017), apresentando variedade na sua composição química. A maioria dos compostos presentes na constituição da própolis já foram descritos, os quais compreendem flavonoides, ácidos aromáticos, ésteres, terpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (BANKOVA et al., 2014; BRAAKHUIS, 2019). Essa variedade ocorre em decorrência da própolis ser produzida a partir de diferentes fontes botânicas de suas respectivas regiões geográficas. A própolis encontrada na América do Norte e na Europa, por exemplo, é produzida a partir do material coletado pelas abelhas de espécies de álamo; em Cuba, Brasil e México, a própolis “vermelha” possui como principal fonte botânica indivíduos do gênero *Dalbergia*, no Mediterrâneo é originada a partir de plantas da família Cupressaceae (Sforcin e Bankova, 2011). No sudeste brasileiro, a principal fonte botânica da própolis “verde” é *Baccharis dracunculifolia* (SALATINO et al., 2005).

Muitos estudos *in vitro e in vivo* demonstraram que a própolis possui propriedades antibacteriana, antiviral, antifúngica, imunomoduladora, antioxidante e antitumoral, entre outras (ZABAIU et al., 2017). Ripari et al. (no prelo) relataram, em um recente trabalho, a ação imunomoduladora da própolis “vermelha” em monócitos humanos quando combinada com imipenem, verificando aumento na atividade bactericida contra uma bactéria multirresistente - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Há trabalhos, no entanto, que buscaram verificar os efeitos de compostos isolados presentes na composição química de amostras de própolis já estudadas. Conti et al. (2013) investigaram os efeitos imunomoduladores do ácido cinâmico, um dos principais compostos fenólicos presente na própolis verde brasileira, em monócitos humanos. Mendez et al., (2023) relataram os efeitos anti-inflamatórios dos principais constituintes da própolis de Sonora (crisina, galangina e pinocembrina) e da própolis em si em células RAW 264.7

Recentemente, foi caracterizada e estudada uma amostra de própolis produzida na caatinga nordestina possui como principal fonte vegetal a espécie *Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir., syn. *M. hostilis*, conhecida popularmente como jurema-preta, contendo 16 flavonoides já descritos, dentre os quais 11 são flavonóis, quatro flavanonas e uma flavanona prenilada, com santin (ST) sendo um flavonol (SON et al., 2022).

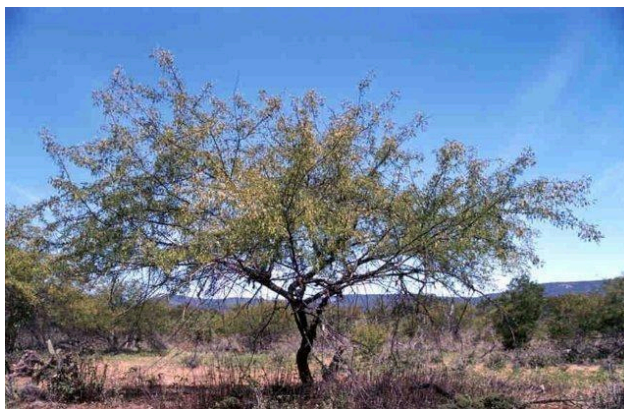


Figura 1. *Mimosa tenuiflora*. Autor: APNE/CNIP.

Há poucos trabalhos verificando as propriedades biológicas do ST. Zhong et al., (2018) observaram seus efeitos nas vias MAPKs e NF- κ B em células THP-1 e MDCKs infectadas pelo vírus influenza A, inibindo sua replicação e a expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-10 nos modelos celulares estudados. Szoka1 et al. (2021) e Klósek et al. (2023) estudaram os efeitos apoptóticos de ST em células cancerígenas de cólon, fígado e estômago. Em um recente estudo realizado pelo nosso grupo, ST exibiu um perfil pró-inflamatório em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de seres humanos saudáveis em condições basais, e um perfil anti-inflamatório em células estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS), o que os levou a concluir que sua ação varia de acordo com as condições experimentais, das concentrações, do período de incubação ou ingestão, sendo esperadas atividades inibitórias ou estimuladoras (SARTORI et al., 2024).

PBMCs são um grupo celular derivadas das células-tronco hematopoiéticas por meio da hematopoiese que compreende as células T, células B, células natural killer (NK) e monócitos, agindo em conjunto frente ao contato do organismo com antígenos sendo um interessante modelo celular a fim de investigar mecanismos imunológicos (DA ROSA, 2023).

Os monócitos, juntamente com as células *natural killers* (NK), neutrófilos e células dendríticas, são as principais células efetoras do sistema imune inato. Constituindo 3% a 8% dos leucócitos circulantes, os monócitos nos tecidos conjuntivos e parênquimas de órgãos, se diferenciam em macrófagos e células dendríticas mieloides, agindo como sentinelas por longos períodos nesses locais. Atuam também como células apresentadoras de antígenos (APCs) na resposta do sistema imune inata através da expressão de moléculas de histocompatibilidade

principal (MHC), visando ativar a resposta imune adaptativa, influenciando, portanto, respostas dos linfócitos T (CRUVINEL, 2010).

No intuito de investigar os mecanismos celulares envolvidos na ação imunomoduladora de ST, o presente trabalho avaliou os efeitos das concentrações desse composto isolado da própolis produzida na caatinga nordestina em uma população de monócitos humanos purificados por um método sofisticado com alto grau de pureza - as *beads* magnéticas, obtidos a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis, utilizando parâmetros de atividade celular como produção de citocinas envolvidas na resposta inflamatória e metabólitos do ácido araquidônico, ação bactericida, produção de espécies reativas de oxigênio e marcadores de superfície celular envolvidos na atividade do monócito.

Metodologia

Obtenção de monócitos humanos e condições experimentais

Amostras de sangue (20 ml) foram coletadas de 5 indivíduos voluntários saudáveis e colocadas em tubos estéreis contendo 0,2 ml de heparina. Após a centrifugação, as células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque. O anel rico em células foi coletado, lavado em meio RPMI 1640 e centrifugado a 1500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspensionado em 1 ml de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Monócitos foram obtidos por seleção negativa, utilizando *beads* magnéticas para obtenção de células CD14+, CD3-, CD7-, CD16-, CD19-, CD56-, CD123- e CD235a- (Miltenyi Biotec Inc.). As células viáveis foram contadas utilizando azul de Tripán 0,2%, ajustando a concentração celular para 1×10^6 monócitos/ml em meio RPMI completo (CARDOSO *et al.*, 2022).

As culturas celulares foram incubadas com três concentrações de ST diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (50, 100 e 200 μ M), por 18 h (SARTORI *et al.*, 2024). Em seguida foi avaliada a viabilidade celular e o sobrenadante da cultura celular foi utilizado para determinar a produção de citocinas.

Para verificar a possível atividade anti-inflamatória, foi adotado o seguinte protocolo: após ativação de monócitos por LPS (0,1 μ g/ml) por 2 h, foi acrescentado o ST à cultura celular

por mais 18 h a 37°C e 5% de CO₂. A adição desta variável à cultura de monócitos previamente incubados com LPS visa simular o tratamento de uma condição inflamatória.

A dexametasona (0,5 µM) foi obtida comercialmente (Sigma, EUA) e utilizada como controle negativo. Para controle do composto isolado, monócitos foram incubados com a porcentagem correspondente à maior concentração de DMSO (0,2%) utilizada.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina, UNESP (CAAE: 65308322.8.0000.5411), Campus de Botucatu, e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Avaliação da viabilidade celular por MTT

Antes de termos realizados os ensaios biológicos, determinamos a viabilidade celular pelo método de redução do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA). Após incubação das culturas celulares com as diferentes concentrações de ST, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 300 µl de MTT dissolvido em meio RPMI completo, seguido de posterior incubação a 37°C por 3 h. Após este período, o MTT foi retirado e foram adicionados 200 µl de DMSO. Em seguida, realizamos a leitura da densidade óptica em leitor de ELISA com filtro de 540 nm e calculamos as porcentagens de viabilidade celular. Os resultados foram expressos em relação ao controle, considerado como 100%.

Determinação de citocinas pela técnica de ELISA

Realizamos a determinação da concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-33 através de ensaio imunoenzimático (ELISA) com o sobrenadante coletado das culturas de monócitos. Inicialmente, adicionamos 100 µl de salina tamponada com fosfato (PBS) e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R & D Systems, EUA) às placas de poliestireno (Maxisorp Nunc, EUA), seguido de incubação *overnight* a 4°C em câmara úmida. Após 3 lavagens dos poços com PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), foi realizado o bloqueio dos poços com albumina sérica bovina (10%) (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS para saturação dos sítios de ligação e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 h. A seguir, uma nova sequência de lavagens foi realizada e alíquotas de 100 µl dos sobrenadantes das culturas de células foram adicionadas com posterior incubação por 2 h a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados, seguida da adição do anticorpo de

detecção policlonal biotilado e do conjugado estreptavidina-peroxidase, incubando-se novamente por 20 minutos. Novas lavagens foram realizadas e, para revelação, foram adicionados 100 µl da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB). Após 30 minutos a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 490 nm.

Determinação de prostaglandina E2 e leucotrieno B4

Para a dosagem de eicosanoides, o sobrenadante da cultura celular foi coletado após as células serem incubadas com os tratamentos por 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. A determinação de prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrieno B4 (LTB4) também foi realizada pelo método de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, EUA). As leituras foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 414 nm.

Expressão de marcadores de superfície celular

Este ensaio avaliou a presença dos marcadores celulares TLR-4, TLR-2, HLA-DR CD62L e CD80 por citometria de fluxo, após incubação com os tratamentos por 18 h. As células (1×10^6 de monócitos/ml) foram incubadas com os estímulos por 18 h a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram adicionados 300 µl de Trypsin EDTA (0.25% - Gibco) para descolar as células, incubando por 4 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados mais 300 µl de soro fetal bovino parando a ação da tripsina, seguido da lavagem dos poços das placas de titulação. Após isso, as culturas foram lavadas e ressuspensas em 30 µl PBS + 0,5% de BSA e incubadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo de luz, com anticorpos monoclonais específicos fluoresceinados anti-TLR2, anti-TLR4, anti-HLA-DR anti-CD62L e anti-CD80, conjugados com seus respectivos marcadores. Para seleção do *gate* dos monócitos CD14+, também marcamos as células com anticorpo monoclonal anti-CD14 com PE/Cy7. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em 270 µl de PBS + 0,05% de BSA, fixadas com 30 µl de solução de fixação com 5% paraformaldeído em PBS e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson)

Em todos os testes foi incluído um tubo controle e as células foram incubadas com anticorpos de controle isotípico marcados com os respectivos fluorocromos dos testes.

Atividade bactericida de monócitos

Monócitos foram distribuídos nas placas de microcultura (5×10^5 células/500 μ l) e estimulados com LPS por 2 h, seguido de incubação com a concentração de ST (200 μ M) por 18 h a 37°C. Esta concentração foi escolhida por apresentar os melhores resultados nos ensaios anteriores. Após este período, o sobrenadante das culturas celulares foi removido e as células foram desafiadas com *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (cepa ATCC 29213), na proporção de 1 monócito para 20 bactérias, incubando novamente a 37°C por 90 min. Monócitos incubados somente com meio de cultura e desafiados com a bactéria foram considerados controle (SANTIAGO et al., 2016). Também foi incluído um poço contendo somente as bactérias sem monócitos.

Após o período de desafio, os sobrenadantes foram coletados e os poços da placa foram submetidos a diversas lavagens com água destilada gelada. Este processo busca a remoção dos monócitos da placa, sua lise e consequente liberação das bactérias que foram eventualmente fagocitadas. Este material foi adicionado ao sobrenadante já coletado, sendo considerado como cultura experimental. O mesmo procedimento foi realizado com as culturas controle.

Ao final deste processo, o material obtido a partir das lavagens com água destilada resultou em um volume de 1,5 ml. Em seguida, 0,5 ml das suspensões foi semeado em três placas contendo meio de cultura Mueller-Hinton e a contagem de colônias foi realizada após 48 h de incubação a 37°C. Este processo visou permitir o crescimento de, no máximo, 200 unidades formadoras de colônias (UFC) bacterianas por placa, tornando a leitura das mesmas mais sensível. A porcentagem (%) de atividade bactericida foi calculada pela fórmula: $\% = (1 - [\text{média UFC placas experimentais}/\text{média UFC placas controle}]) \times 100$.

Produção de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as células foram cultivadas e incubadas com ST (200 μ M) por 18 h a 37°C e 5% de CO₂. Ao final da incubação, as células foram descoladas com 300 μ l de tripsina EDTA (0.25% - Gibco) para descolar as células e incubadas por 4 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados mais 300 μ l de soro fetal bovino parando a ação da tripsina, seguida da lavagem dos poços das placas de titulação. Após isso, as culturas foram lavadas e ressuspensas com 500 μ l de *dichlorodihydrofluorescein diacetate* (DCFH-DA) diluído a 1 μ M em PBS, e incubadas por 40 min. As células sem marcação foram ressuspensas com 200 μ l de PBS. Posteriormente, as

células foram lavadas e ressuspensas com 1 ml de água oxigenada (5 mM) diluída em PBS e incubadas por 10 minutos. As células não estimuladas com H₂O₂ foram ressuspensas com μ l de PBS. Finada a incubação, foram adicionados mais 3 ml de PBS a fim de diluir a concentração de H₂O₂ e reduzir seu estímulo sobre as células. Em seguida, as células foram lavadas e o sobrenadante descartado. Por fim, as células foram ressuspensas em 150 μ l de PBS e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson)

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism 8 (GraphPad, USA), utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados

Viabilidade celular

Inicialmente, foi verificada a viabilidade celular dos monócitos após terem sido tratados e incubados com as concentrações do ST (50, 100 e 200 μ M) a fim de investigar possíveis efeitos citotóxicos na ausência (Figura 1) e na presença de LPS (Figura 2) antes de realizarmos os demais ensaios experimentais. Os resultados deste ensaio se encontram nas figuras abaixo.

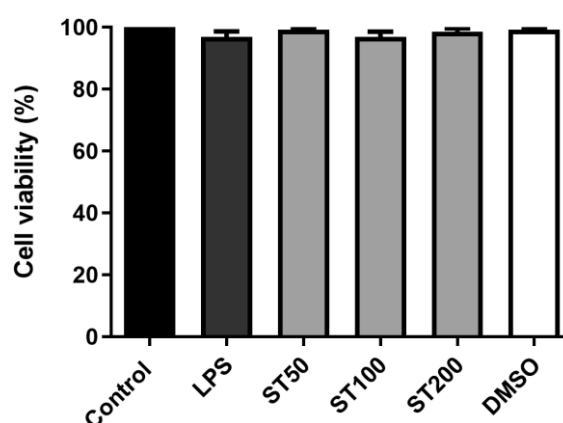


Figura 1: Viabilidade (%) de monócitos humanos (1×10^6 células/ml), na ausência de LPS, após 18 h de tratamento com RPMI 1640 (controle - Control), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), santin (ST – 50, 100 e 200 μ M) ou DMSO. Os dados representam a média e desvio-padrão ($n = 5$). $P > 0,05$.

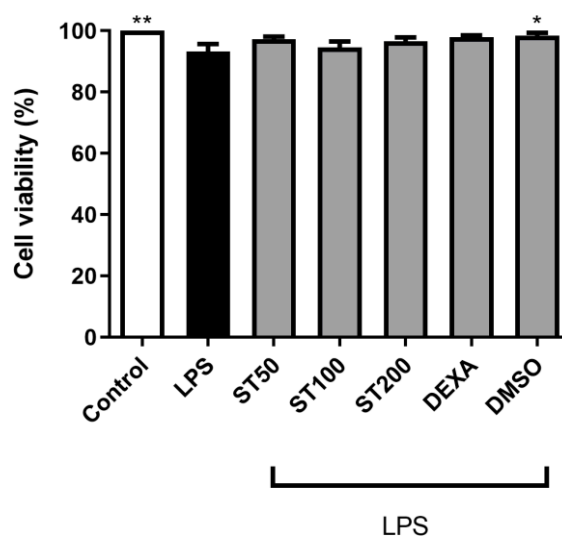


Figura 2: Viabilidade (%) de monócitos humanos (1×10^6 células/ml) após incubação por 2 h com LPS, seguido de incubação por mais 18 h com RPMI 1640 (controle - Control), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), santin (ST – 50, 100 e 200 μ M), DMSO e dexametasona (DEXA – 0.5 μ M). Os dados representam a média e desvio-padrão (n = 5). *P < 0,05; **P < 0,05 vs LPS.

De acordo com os dados obtidos, o ST não afetou a viabilidade celular dos monócitos em todas as concentrações utilizadas nesse experimento. DMSO - solvente utilizado para as alíquotas do ST também não apresentou efeito citotóxico nas células, o que condiz com os resultados obtidos por Sartori et al. (2024), obtendo média de viabilidade superior a 90% em todos os tratamentos, o que é considerado um valor adequado para os testes biológicos (Kong *et al.*, 2008).

Produção de citocinas em condições basais pelos monócitos

Finalizados os ensaios de viabilidade celular, foi determinada a produção de citocinas pelos monócitos, quando tratados com ST em condições basais, pelo método de ELISA sanduíche, as quais são: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18. Os achados sugerem que ST (200 μ M) estimulou não significativamente a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Em relação à produção de IL-18, ST parece exercer efeito estimulador embora não significativo, mas não afetou a produção de IL-10.

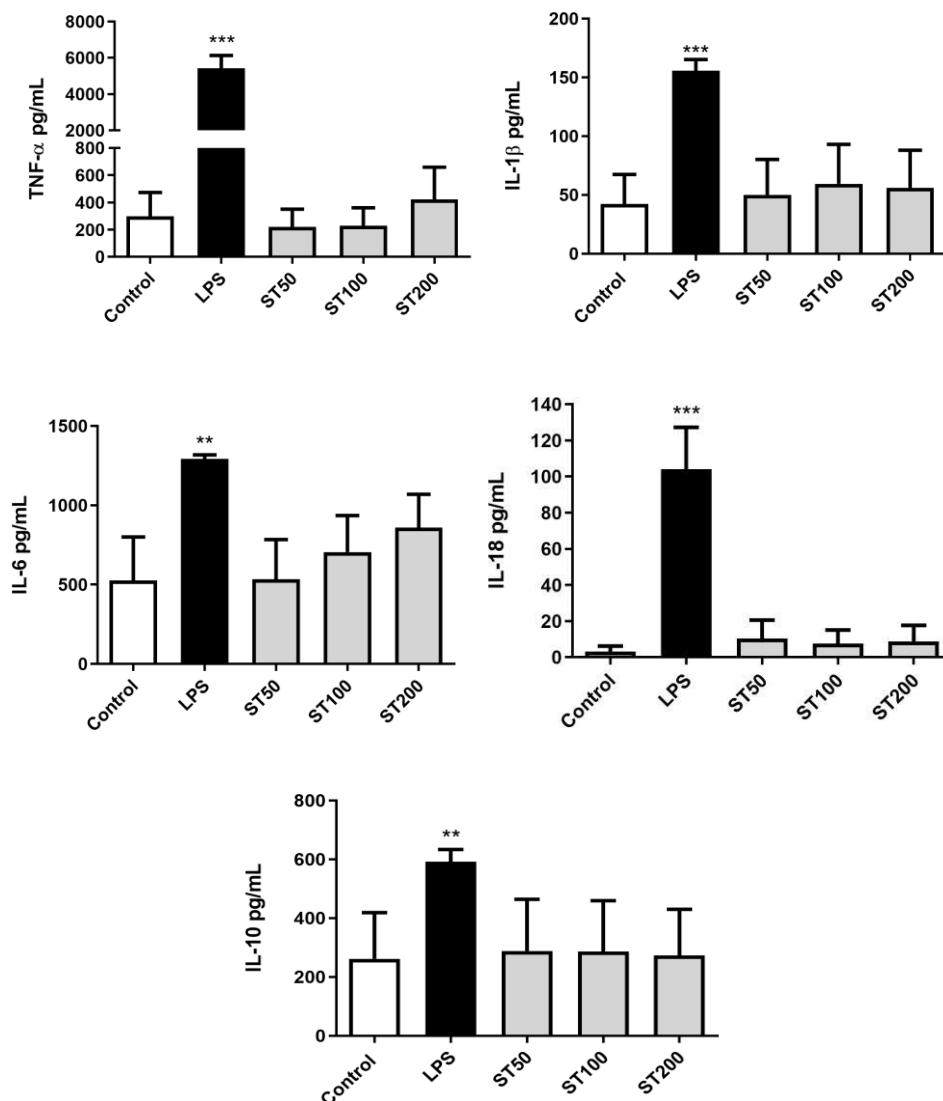


Figura 3: Produção basal de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18 e IL-10 (pg/ml) por monócitos humanos (1×10^6 células/ml) incubados por 18 h com RPMI 1640 (controle – Control), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), ou santin (ST – 50, 100 e 200 μ M). **P < 0,01; ***P < 0,001.

Produção de citocinas pelos monócitos estimulados por LPS

Antes de iniciarmos os ensaios anti-inflamatórios, realizamos os ensaios de ELISA para dosar a produção de citocinas pelos monócitos quando incubados com LPS por 2 horas e posteriormente com os tratamentos por 18 horas (Figura 4).

Em relação à produção de TNF- α , todas as concentrações de ST potencializam a ação do LPS sobre os monócitos, diferentemente da produção de IL-1 β , a qual não pareceu sofrer

efeitos significativos da ação do mesmo. Não houve efeitos também na produção de IL-6, porém, na produção de IL-10, todas as concentrações do santin analisadas reduziram sua produção de forma significativa. Na produção de IL-33, santin pareceu potencializar o efeito do LPS, mas não de forma significativa.

A partir da dosagem de IL-33, passamos a utilizar apenas a concentração de 200 μM de santin, pois foi a concentração que apresentou maior consistência nos dados adquiridos com monócitos e PBMCs.

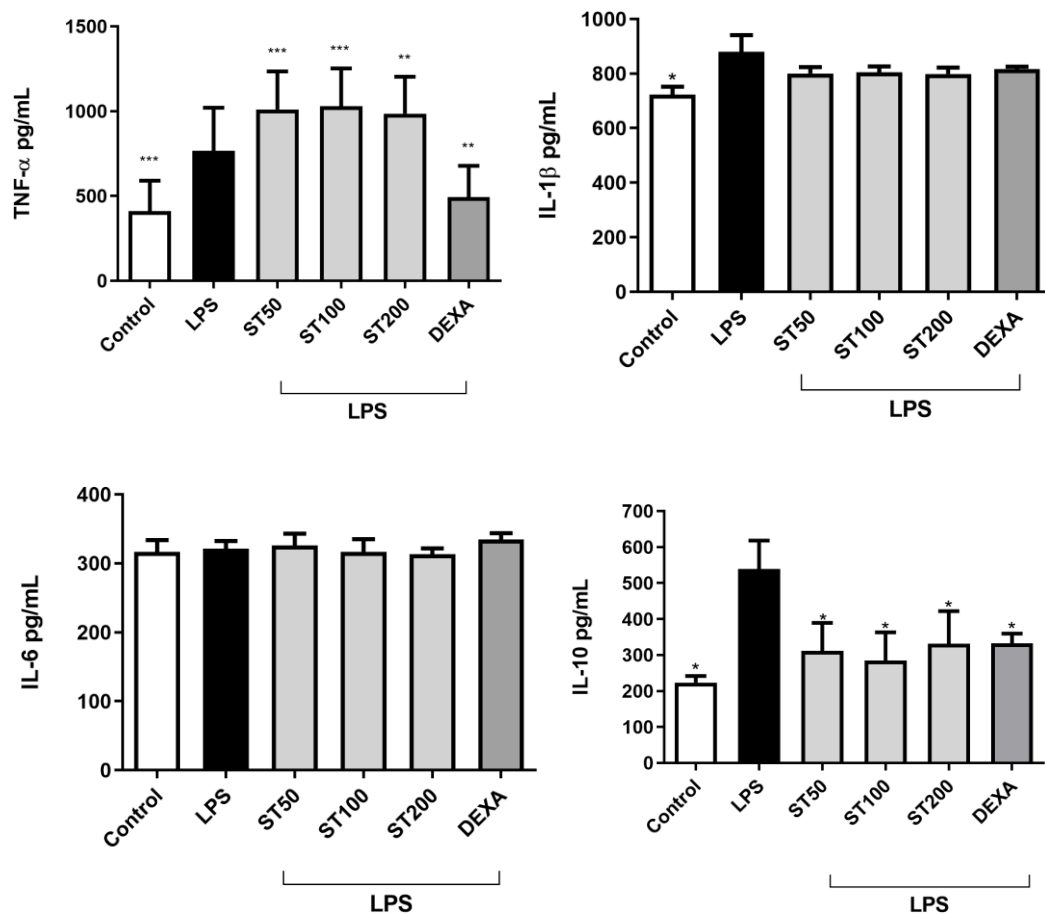


Figura 4: Produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 (pg/ml) por monócitos humanos (1×10^6 células/ml) incubados com RPMI 1640 (controle – Control), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), ou após incubação com LPS (100 ng/ml) por 2 h seguido de incubação por 18 h com santin (ST –50, 100 e 200 μM), ou dexametasona (DEXA – 10 μM). Os dados representam a média e desvio-padrão (n = 5). *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001 vs LPS.

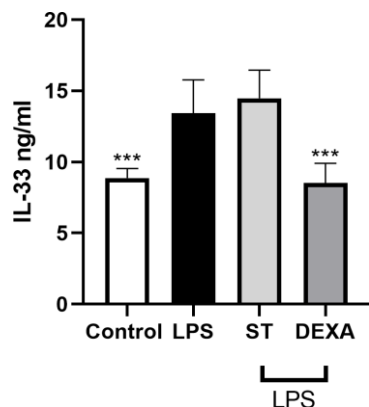


Figura 5: Produção de IL-33 (pg/ml) por monócitos humanos (1×10^6 células/ml) incubados com RPMI 1640 (controle – Control), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), ou após incubação com LPS (100 ng/ml) por 2 h seguido de incubação por 18 h com santin (ST–200 μ M), ou dexametasona (DEXA – 10 μ M). Os dados representam a média e desvio - padrão (n = 5). ***P < 0,001 vs LPS.

A partir da dosagem de IL-33, passamos a utilizar apenas a concentração de 200 μ M de santin, pois foi a concentração que apresentou maior consistência nos dados adquiridos com monócitos e PBMCs.

Produção de eicosanoides

A produção basal de PGE2 e LTB4 foi determinada após incubação de monócitos com LPS por 2 h, seguido de incubação com os tratamentos por mais 3 h. De acordo com os dados, ST parece reduzir a produção de PGE2 e LTB4, porém de forma não significativa.

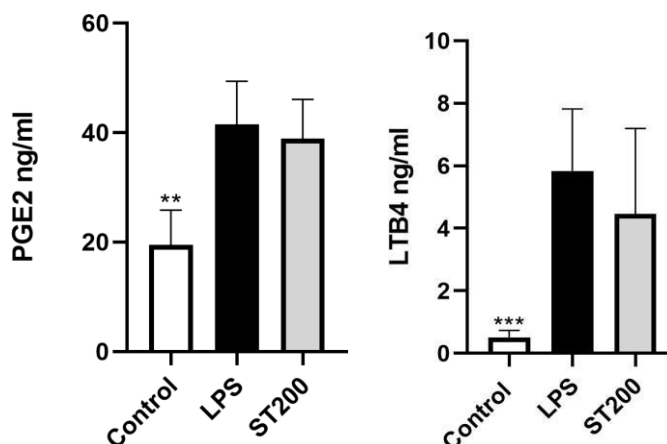


Figura 6: Produção de PGE2 e LTB4 (ng/ml) por monócitos humanos (1×10^6 células/ml) após incubação com LPS (100 ng/ml) por 2 h seguido de incubação por 3 h com RPMI 1640 (controle – Control), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), santin (ST – 200 μ M). Os dados representam a média e desvio-padrão (n = 5). **P < 0,01; ***P < 0,001 vs LPS.

Expressão de marcadores de superfície celular e grau de pureza por *microbeads* magnéticas

O grau de purificação do processo de separação por *microbeads* magnéticas e a expressão de marcadores de superfície celular foi analisada por meio da técnica de citometria de fluxo após a incubação das células com a concentração de ST 200 μ M (Figura 7 e figura 8, respectivamente). Os marcadores analisados foram: TLR-4, TLR-2, HLA-DR, CD62L e CD80.

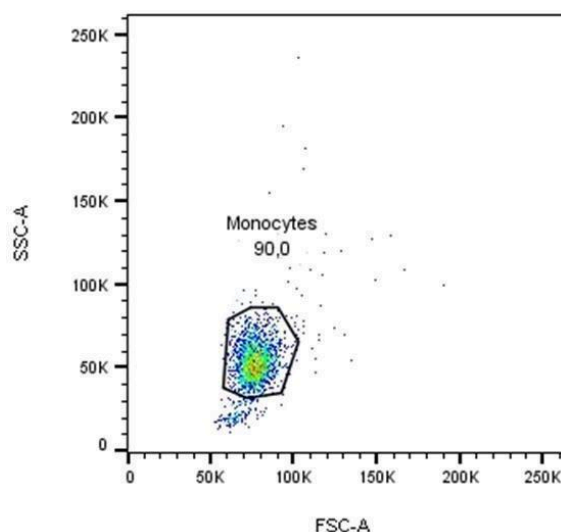


Figura 7: Dot plot relacionado ao tamanho (FSC-A) x granulosidade (SSC-A) de monócitos, revelando a porcentagem de células obtidas (90,0%) por citometria de fluxo.

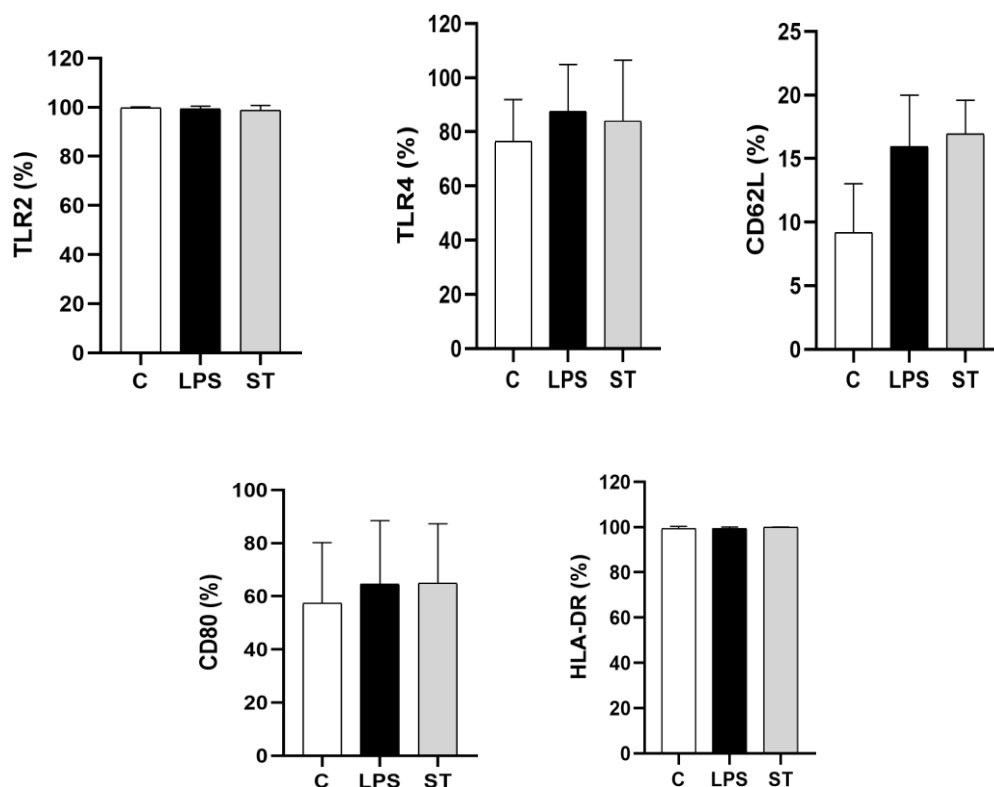


Figura 8: Expressão de TLR-2, TLR-4, CD62L, CD80 e HLA-DR por monócitos humanos (1×10^6 células/ml) incubados por 18 h com RPMI 1640 (controle – C), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), ou santin (ST – 200 μ M).

Conforme observado, o método de separação por *microbeads* magnéticas demonstrou 90% de grau de purificação, o que revelou ser um método eficaz e refinado. Os gráficos demonstram que ST não exerceu efeitos significativos na expressão dos marcadores de superfície analisados, apenas CD62L apresentou um aumento discreto em sua expressão. Observa-se também um elevado desvio-padrão nos resultados, o que não é surpreendente nos ensaios com células humanas.

Avaliação da atividade bactericida de monócitos

Ao término da incubação de 48 h das placas contendo as bactérias semeadas provenientes do lisado da cultura celular, foi efetuado o cálculo para expressar a atividade microbicida. O LPS foi utilizado como controle positivo (Figura 9).

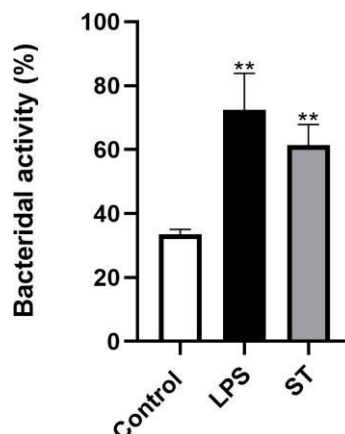


Figura 9: Atividade bactericida de monócitos humanos (1×10^6 células/ml) após incubação de 18 h com RPMI 1640 (controle – Control), lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml), santin (ST – 200 μ M) e desafiadas por 90 min com *Staphylococcus aureus* metilina-sensível (cepa ATCC 29213). Os dados representam a média e desvio-padrão (n = 5). **P < 0,01 vs C.

A figura 9 demonstra que o ST induziu aumento significativo na ação bactericida dos monócitos sobre as bactérias em relação ao controle chegando próximo ao grau de atividade bactericida do LPS.

Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Ao final da incubação com os tratamentos por 18 h, as células foram marcadas com DCFH-DA e estimuladas por H_2O_2 . A produção de EROs pelos monócitos foi analisada pela técnica de citometria de fluxo (Figura 10). De acordo com esta figura, ST induziu a produção de EROs nos monócitos em relação ao controle estimulado e marcado, e ao controle não marcado e não estimulado.

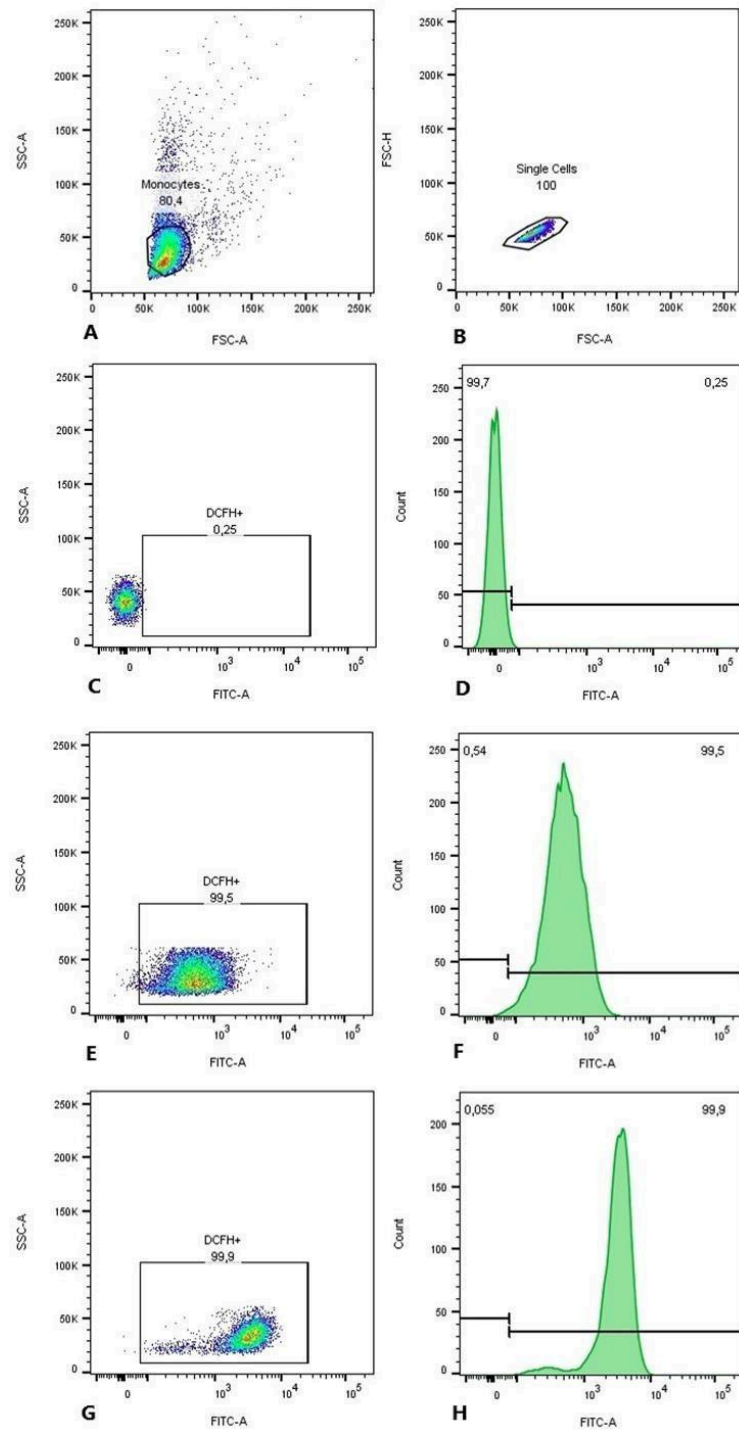


Figura 10: Figura representativa da análise de espécies reativas de oxigênio através do *dichlorodihydrofluorescein diacetate* (DCFH-DA) pela técnica de citometria de fluxo. **(A)** Estratégia de *gate* de monócitos baseado em tamanho e granulosidade esperados para a população. **(B)** *Gate singlets*. **(C)** Dot plot de monócitos controle não marcado com DCFH. **(D)** Histograma de monócitos controle não marcado com DCFH. **(E)** Dot plot de monócitos controle marcado com DCFH. **(F)** Histograma de monócitos controle marcado com DCFH. **(G)**

Dot plot de monócitos tratados com santin e marcado com DCFH. **(H)** Histograma de monócitos tratados com santin marcado com DCFH.

Discussão

A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas a partir de materiais coletados costumeiramente de fontes vegetais (ZABAIUO et al., 2017), apresentando composição química variada, em decorrência de sua produção ter origem a partir de diferentes fontes botânicas de suas respectivas regiões geográficas (Sforcin e Bankova, 2011). A própolis “verde” encontrada no sudoeste brasileiro é coletada principalmente a partir da *Baccharis dracunculifolia* (SALATINO et al., 2005). Já a própolis da caatinga nordestina, produzida principalmente no Rio Grande do Norte e recém-descoberta, possui como principal fonte botânica a planta *Mimosa tenuiflora* (Ferreira et al. 2017). SON et al. (2022) descreveram a composição química da própolis da caatinga, a qual possui 16 flavonoides, sendo santin um dos correspondentes.

No presente estudo, ST demonstrou ter efeitos, mesmo que discretos, na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, e nenhum efeito na produção de IL-10 sob condições basais. Sartori et al. (2024) investigaram os efeitos de ST, do extrato da própolis da caatinga e outros compostos isolados da própolis em PBMCs, e concluíram que ST (100 μ M) estimulou a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 das células sob condições basais.

Em nosso trabalho, ST potencializou o efeito do estímulo feito por LPS na produção de TNF- α e inibiu a produção de IL-10, na produção de IL-1 β e IL-6 não pareceu surtir efeito nos monócitos. No que tange a produção de IL-33, houve um leve aumento nas células tratadas com ST. Sob condições inflamatórias estimuladas por LPS, ST inibiu as produções de TNF- α , IL-1 β e IL-10 em PBMCs variando sua atividade de acordo com a sua concentração (Sartori et al., 2024). Zhong et al. (2019), por sua vez, relataram que ST inibiu a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, e IL-10 por células THP-1 previamente infectadas pelo vírus influenza A. Os dados obtidos sugerem que os efeitos de ST na produção das citocinas citadas por PBMC, conforme observado por Sartori et al. (2024), não dependem da ação direta dos monócitos, mas sim das demais células que compreendem o grupo de PBMCs. O DMSO não apresentou influência na produção das citocinas tampouco afetou a viabilidade celular, evidenciando que os dados aqui apresentados não tiveram influência do solvente utilizado.

Há poucos estudos investigando as propriedades biológicas de ST, sobretudo em células do sistema imunológico em relação aos parâmetros analisados e a seguir discutidos.

Em relação à produção de eicosanoides, ST não exerceu efeitos significativos quando comparados ao LPS, apenas reduzindo de maneira discreta as produções de PGE2 e LTB4. Na produção de LTB4, o desvio-padrão de ST e LPS demonstraram alta variabilidade nas respostas dos monócitos coletados, o que demonstra a grande variabilidade eventualmente observada nos ensaios com células humanas.

Os resultados da citometria de fluxo sugerem que o processo de separação por seleção negativa por *microbeads* magnéticas apresentou alta eficácia e refinamento, tendo em vista a porcentagem de pureza acusadas pela citometria.

Búfalo et al. (2024) avaliaram os possíveis alvos dos compostos da própolis verde brasileira, expondo que o bloqueio de TLR-2 e TLR-4 inibiu a produção de citocinas pelos monócitos, indicando que os constituintes da própolis podem se ligar a esses receptores para exercer sua ação. Neste trabalho, ST pareceu não afetar a expressão de todos os marcadores analisados em relação ao controle, além de ser possível notar o alto desvio-padrão em todos os tratamentos na expressão de TLR-4, CD62L e CD80. Vale salientar que nem mesmo o LPS, chegou a estimular as expressões dos marcadores alvos deste estudo de forma significativa em relação ao controle. Vega et al. (2021) relataram que, mesmo que o estímulo por LPS tenha sido bem descrito como uma forma para levar monócitos humanos a condições semelhantes à inflamação, ele pode levar a uma condição semelhante à tolerância ao induzir anergia, o que poderia explicar os resultados obtidos nos ensaios de citometria de citometria.

Nos ensaios de atividade bactericida contra *S. aureus* meticilina-sensível, os monócitos tratados com ST apresentaram aumento em sua atividade microbicida em relação ao controle, com diferença estatística significativa. Ademais, monócitos tratados com ST apresentaram aumento na produção de EROs em relação ao controle. Com ambos os dados apresentados, pode-se inferir que a atividade bactericida dos monócitos tratados com ST seja provavelmente devida ao aumento na produção de EROs induzida por ST, o qual é provavelmente um dos mecanismos utilizados pelos monócitos na eliminação de microorganismos. Contudo, seria necessário analisar mais parâmetros de resposta imunológica dos monócitos frente à exposição de bactérias patogênicas para avaliar seu potencial antimicrobiano.

A elevada variabilidade nos resultados quanto à produção de eicosanoides e na citometria de fluxo quando comparada com estudos em animais pode ser devida a diferentes fatores, tais como estilo de vida, histórico genético, fatores ambientais, entre outros, fatores

estes que tornam a resposta imune sujeita a várias influências, resultando em respostas variáveis e inconsistentes para cada indivíduo quando comparados entre si.

Estudos demonstraram que a própolis e seus compostos isolados podem exercer atividades pró-inflamatórias bem como anti-inflamatórias, dependendo da concentração, do período de incubação ou ingestão e das condições experimentais *in vitro* ou *in vivo*, com atividades inibitórias ou estimulatórias sendo esperadas (Sforcin e Bankova, 2011).

Nossos achados sugerem os efeitos imunomoduladores do ST isolado da própolis da caatinga nordestina em monócitos humanos, mesmo sendo difícil concluir o real papel do ST na atividade dos monócitos tanto em condições basais quanto em condições inflamatórias observados nos estudos em PBMCs. Seus efeitos parecem variar de acordo com as condições experimentais, concentrações e modelo celular utilizado, além das variações recorrentes da atividade celular humana. Além disso, há poucos trabalhos investigando as propriedades do ST em células humanas, especificamente em células do sistema imunológico, dificultando realizar comparações e questionamentos frente aos resultados obtidos.

Conclusão

O presente trabalho trouxe pistas quanto a atividade imunomoduladora do ST em concentrações não-citotóxicas sob condições estimuladas por LPS, potencializando os efeitos do estimulante na produção de citocinas inflamatórias e inibindo a produção de citocinas anti-inflamatórias. A expressão de marcadores de superfície e a produção de eicosanoides demonstraram grande variabilidade, porém sem diferenças significativas. A produção de EROs parece estar envolvida na atividade bactericida dos monócitos tratados com ST.

Esses achados abrem margens para investigações desse composto e demais constituintes da própolis sobre células humanas quanto ao seu envolvimento na resposta imunológica.

Referências bibliográficas

- BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, v. 8, p. 28, 2014.
- BRAAKHUIS, A. Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*, v. 11, n. 11, p. 2705, 2019.
- BÚFALO, M. C. et al. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 66, p. 1497-1504, 2014.
- CONTI, B. J. et al. Cinnamic acid is partially involved in propolis immunomodulatory action on human monocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 109864, 2013.
- CRUVINEL, W. de M. et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-461, jul.-ago. 2010.
- DA ROSA, P. C. et al. The physical exercise-induced oxidative/inflammatory response in peripheral blood mononuclear cells: signaling cellular energetic stress situations. *Life Sciences*, v. 321, p. 121440, 2023.
- KLÓSEK, M. et al. Santin (5,7-dihydroxy-3,6,4'-trimethoxy-flavone) enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells. *Life (Basel)*, v. 13, n. 2, p. 592, 2023.
- MENDEZ-ENCINAS, M. A. et al. Anti-inflammatory potential of seasonal Sonoran propolis extracts and some of their main constituents. *Molecules*, v. 28, n. 11, p. 4496, 2023.
- RIPARI, N. et al. Brazilian red propolis synergistically with imipenem modulates immunological parameters and the bactericidal activity of human monocytes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, no prelo.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? *Apidologie*, v. 52, p. 1075-1097, 2021.

- SARTORI, A. A. et al. Effects of caatinga propolis from *Mimosa tenuiflora* and its constituents (santin, sakuranetin and kaempferide) on human immune cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 319, p. 117297, 2024.
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.
- SZOKA, L. et al. Santin and cirsimaritin from *Betula pubescens* and *Betula pendula* buds induce apoptosis in human digestive system cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 25, n. 24, p. 11085-11096, 2021.
- VEGA CA, Karakike E, Bartolo F et al. Differential response induced by LPS and MPLA in immunocompetent and septic individuals. *Clin Immunol* 2021; 226: 108714.
- ZABAIYOU, N. et al. Biological properties of propolis extracts: something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 207, p. 214-222, 2017.
- ZHONG, M. et al. Santin inhibits influenza A virus replication through regulating MAPKs and NF- κ B pathways. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 21, n. 12, p. 1205-1214, 2019.