



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

# EFEITO IMUNOMODULADOR DA GEOPRÓPOLIS ASSOCIADA À DEXAMETASONA SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

**MARIANA DA SILVA HONORIO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN**

**COORIENTADORA: DR<sup>a</sup>. KARINA BASSO SANTIAGO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas – Estrutura e Função.

**BOTUCATU – SP**

**2022**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DA GEOPRÓPOLIS ASSOCIADA À  
DEXAMETASONA SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DO  
SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

**MARIANA DA SILVA HONORIO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN**

**COORIENTADORA: DR<sup>a</sup>. KARINA BASSO SANTIAGO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas – Estrutura e Função.

**BOTUCATU – SP**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Honorio, Mariana da Silva.

Efeito imunomodulador da geoprópolis associada à dexametasona sobre células do sangue periférico humano / Mariana da Silva Honorio. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Maurício Sforcin

Coorientador: Karina Basso Santiago

Capes: 21100004

1. Geoprópolis.
2. Abelha - Produtos.
3. Dexametasona.
4. Imunomodulação.
5. Leucócitos mononucleares.
6. Inflamação.

Palavras-chave: Geoprópolis; Imunomodulação; Inflamação; PBMC.

## *Agradecimentos*

Aos meus pais, Ana Maria da Silva Honorio e Ailton José Honorio, por sempre incentivarem e apoiarem os meus estudos e as minhas escolhas.

Aos meus tios, Adenilda Cristina Honorio França e Eduardo Luzia França, por me influenciarem no caminho da pesquisa e no amor pela ciência.

À minhas irmãs, Patrícia da Silva Antunes, Danielle Cristina Honorio França e Emanuelle Carolina Honorio França, e aos demais familiares, por acreditarem em mim e sempre estarem ao meu lado me incentivando a ser uma pessoa melhor.

Às minhas amigas Jaqueline Gracielle da Silva e Heloana Muniz Viana por todo carinho, incentivo e amizade mesmo de longe.

Aos demais amigos que estiveram ao meu lado nos últimos anos me apoiando, e aconselhando a sempre seguir em frente.

A meu orientador, José Maurício Sforcin, pela confiança em me oferecer a oportunidade de fazer parte de uma ótima equipe. E por todo apoio e conhecimento compartilhado ao longo do desenvolvimento deste trabalho, que me levaram ao crescimento científico e pessoal.

À minha co-orientadora Karina Basso Santiago, e os demais membros do laboratório, Arthur, Eliza, Fernanda, Karen e Nicolas, por todo auxílio na pesquisa, os ensinamentos e momentos de descontração na rotina de laboratório.

Ao professor William Zambuzi, e à Dra. Geórgia Feltran por todo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao departamento de Ciências Químicas e Biológicas por toda a infraestrutura, e pelos alunos e docentes que fazem parte do nosso dia-a-dia.

Ao Programa Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada por toda ajuda fornecida na resolução de dúvidas durante esses 2 anos de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida (2019-2022).

“O COMEÇO DE TODAS AS CIÊNCIAS É O ESPANTO DE AS COISAS SEREM O QUE SÃO”

(ARISTÓTELES)

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Definição por extenso	Em inglês
CNM	Cinamoiloxi-mammeisina	Cinnamoyloxy-mammeisin
COX	Ciclo-oxigenase	Cyclooxygenase
DMSO	Dimetilsulfóxido	Dimethylsulfoxide
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Cinase regulada por fatores extracelulares	Extracellular signal-regulated kinase
HLA	Antígeno leucocitário humano	Human leukocyte antigen
IKB $\alpha$	Proteína inibitória kappa B alpha	I kappa B alpha
IL	Interleucina	Interleukin
LPS	Lipopolissacárideo	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotrieno B4	Leukotriene B4
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos	Mitogen-activated protein kinase
MTT	Brometo de 3-4,5 dimetil-tiazol-2-il-2,5 difeniltetrazólio	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B	Nuclear factor kappa B
NK cells	Células exterminadoras Naturais	Natural killer cells
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Salina tamponada com Fostato	Phosphate buffered saline
PGE2	Prostaglandina E2	Prostaglandin E2
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute	Roswell Park Memorial Institute
TLR	Receptor Toll-símile	Toll-like receptor
TMB	3,3',5,5'Tetrametilbenzidina	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidine
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa	Tumor necrosis factor alpha

## RESUMO

A resposta inflamatória pode ser desencadeada por inúmeros estímulos e condições nocivas, podendo ser aguda ou crônica. Diferentes intervenções terapêuticas têm sido avaliadas para tratamento do processo inflamatório, devido à sua complexidade e diversidade de células e mediadores fisiológicos envolvidos. Neste contexto, o uso de produtos naturais tem propiciado o surgimento de terapias alternativas ou descoberta de novos medicamentos com ação anti-inflamatória. A geoprópolis (GEO) é um produto elaborado por abelhas sem ferrão (meliponíneos) e apresenta diversas propriedades biológicas. O presente trabalho foi delineado visando avaliar o possível sinergismo entre a geoprópolis e o fármaco anti-inflamatório dexametasona (DEX) em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). A viabilidade de PBMCs foi avaliada pelo método do MTT, apoptose/necrose por citometria de fluxo, a produção de citocinas e eicosanoides por ELISA e a expressão de vias intracelulares por RT-qPCR. Os tratamentos isolados e sua combinação não afetaram a viabilidade celular e apresentaram efeito inibitório na produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10). Os tratamentos não induziram alterações biologicamente relevantes na produção de leucotrieno B4 e na expressão das vias do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK. Pode-se concluir que a combinação GEO + DEX, apesar de nem sempre se apresentar mais eficiente do que os tratamentos isolados, parece promissora e sua utilização permitiria uso da DEX em menores concentrações, diminuindo os efeitos adversos causados pelo tratamento contínuo com este anti-inflamatório, principalmente em células envolvidas na resposta imune.

**Palavras-chave:** inflamação; PBMC; imunomodulação; geoprópolis.

# **IMMUNOMODULATORY EFFECT OF GEOPROPOLIS ASSOCIATED WITH DEXAMETASONE ON MONONUCLEAR CELLS OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD**

## **ABSTRACT**

The inflammatory response can be triggered by numerous stimuli and harmful conditions and can be acute or chronic. Different therapeutic interventions have been evaluated for the treatment of the inflammatory process, due to its complexity and diversity of cells and physiological mediators involved. In this context, the use of natural products has led to the emergence of alternative therapies or the discovery of new drugs with anti-inflammatory action. Geopropolis (GEO) is a product made by stingless bees (meliponineos) and has several biological properties. The present work was designed to evaluate a possible synergism between GEO and the anti-inflammatory drug dexamethasone (DEX) in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by lipopolysaccharide (LPS). PBMCs viability was evaluated by the MTT method, apoptosis/necrosis by flow cytometry, cytokines and eicosanoids production by ELISA and intracellular pathways by RT-qPCR. The isolated treatments and their combination did not affect cell viability and inhibited cytokines production (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10). The treatments did not induce biologically relevant alterations in leukotriene B4 production and in NF- $\kappa$ B and p38 MAPK pathways. One may conclude that the combination GEO + DEX, despite not always being more efficient than the isolated treatments, seems promising and would allow the use of DEX in lower concentrations, reducing adverse effects caused by the continuous treatment with this drug, mainly in cells involved in the immune response.

**Keywords:** inflammation; PBMC; immunomodulation; geopropolis.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.</b>	<b>Obtenção das amostras de geoprópolis.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.</b>	<b>Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e da solução de dexametasona .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.</b>	<b>Obtenção de PBMCs humanas.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4.</b>	<b>Avaliação da viabilidade celular .....</b>	<b>19</b>
<b>3.5.</b>	<b>Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.</b>	<b>Avaliação de vias intracelulares por RT-qPCR.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7.</b>	<b>Determinação de citocinas pela técnica de ELISA .....</b>	<b>22</b>
<b>3.8.</b>	<b>Dosagem de eicosanoides .....</b>	<b>22</b>
<b>3.9.</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.</b>	<b>Viabilidade celular.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2.</b>	<b>Apoptose e necrose por citometria de fluxo .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.</b>	<b>Avaliação de vias intracelulares.....</b>	<b>25</b>
<b>4.4.</b>	<b>Determinação de citocinas pela técnica de ELISA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5.</b>	<b>Determinação de Eicosanóides pela técnica de ELISA.....</b>	<b>30</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação ou resposta inflamatória pode ser desencadeada por inúmeros estímulos e condições nocivas, tais como agentes patogênicos ou alergênicos, compostos tóxicos ou por lesão tecidual, entre outros. A lógica fisiológica da inflamação induzida por uma infecção é clara, porém, outros tipos de resposta inflamatória são conhecidos apenas em contextos patológicos, como, por exemplo, em doenças autoimunes. Independentemente da causa, a inflamação evoluiu como uma resposta biológica visando restaurar a homeostase e a proteção do indivíduo (MEDZHITOV, 2008; ARULSELVAN *et al.*, 2016; AZAB *et al.*, 2016).

Os efeitos benéficos da resposta inflamatória e seu potencial de lesão tecidual precisam estar em equilíbrio, caso contrário podem ser prejudiciais ao organismo. Trata-se de um importante mecanismo de defesa; entretanto, se não controlado, pode prevalecer seu lado negativo, promovendo diversas condições patológicas, tais como asma, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, entre outras (SIMMONS, 2006).

A inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica. A inflamação aguda compreende a primeira resposta à lesão celular e tecidual, e foi melhor caracterizada em infecções microbianas (particularmente bacterianas), durando de poucos minutos a poucos dias. Sua principal característica é a presença de certos mediadores no plasma e influxo de leucócitos no sítio inflamatório (ARULSELVAN *et al.*, 2016). O processo inflamatório agudo é iniciado pela migração de células do sistema imunológico, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, basófilos, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas, levando à produção e liberação de uma ampla variedade de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas, bem como ativação de fatores de transcrição. O principal e mais imediato efeito desses mediadores é provocar um exudato inflamatório local (MEDZHITOV, 2008; ANDRADE *et al.*, 2017).

Localmente, a inflamação caracteriza-se pelos sinais cardinais como edema, calor, rubor, dor e perda da função, ocasionando frequentemente destruição tecidual, porém, transitória, havendo posteriormente a regeneração ou cicatrização da área afetada (MEDZHITOV, 2008; FRANCESCHI & CAMPISI, 2014; FOUGÈRE *et al.*, 2016).

A partir da fase aguda pode ocorrer a cronicidade do processo com a não eliminação

do agente agressor e persistência da liberação de mediadores que causam sensibilização de nociceptores ou sua ativação, estabelecendo a dor, que é a principal queixa de portadores de doenças inflamatórias, além de possivelmente ocorrer a perda de função (FRANCESCHI & CAMPISI, 2014).

A inflamação crônica pode ocorrer, por exemplo, quando não há resolução quanto à eliminação de agentes infecciosos e resistência dos mesmos aos mecanismos de defesa do hospedeiro, ou em resposta a corpos estranhos não removidos, exposição química contínua, entre outros fatores (ARULSELVAN *et al.*, 2016). A inflamação crônica, bem como sua gravidade e progressão, está relacionada à persistência na produção de citocinas pró-inflamatórias e desencadeamento de lesões. Entre elas, a IL-18 é considerada como importante determinante do grau de severidade das doenças, principalmente nos processos crônicos (LI *et al.*, 2019).

Há vários mecanismos que operam para encerrar o processo inflamatório e iniciar a remodelação do tecido, chamados coletivamente de resolução inflamatória. Tal resolução é mediada por eicosanoides anti-inflamatórios, como lipoxinas e maresinas (SERHAN & LEVY, 2018).

As citocinas podem atuar perpetuando ou atenuando a resposta inflamatória de acordo com o microambiente no qual se encontram, atuando como pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, respectivamente. Alguns exemplos de citocinas pró-inflamatórias são: interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , além de mediadores como a histamina, cininas, fatores de coagulação, fatores de complemento, óxido nítrico, prostaglandinas e leucotrienos, que também são considerados pró-inflamatórios. As citocinas anti-inflamatórias incluem: IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$ . Além disso, também são considerados notáveis mediadores anti-inflamatórios os glicocorticoides (TURNER *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017).

Outras citocinas também importantes no processo inflamatório são a IL-18 e a IL-33, consideradas membros da família da IL-1. A IL-18, assim como a IL-1, é sintetizada como precursora inativa e é ativada após clivagem enzimática pela caspase-1. A IL-33 está envolvida na dor durante a resposta inflamatória. A liberação de sua forma bioativa funciona como um “gatilho” inflamatório, agindo de forma autócrina e parácrina, e sua sinalização ocorre através da via do receptor ST2 (ALENCAR *et al.*, 2005).

Outros mediadores são essenciais na resposta inflamatória, como o ácido

araquidônico, que é um ácido graxo poli-insaturado associado a fosfolipídios de membranas celulares. Os fosfolipídios liberam o ácido araquidônico em resposta à enzima fosfolipase A2, a qual é ativada após uma série de estímulos fisiológicos, farmacológicos e patológicos. O ácido araquidônico, por sua vez, pode originar mediadores importantes através de duas vias enzimáticas distintas. A ação da ciclo-oxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico origina metabólitos como os eicosanoides, que são as prostaglandinas e tromboxanos, e os leucotrienos são gerados a partir da lipoxigenase (ALENCAR *et al.*, 2005).

As prostaglandinas participam de diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como vasodilatação ou vasoconstrição, hiperalgesia, contração ou relaxamento da musculatura lisa, hipotensão, entre outros (ALENCAR *et al.*, 2005). A prostaglandina E2 (PGE2) é uma das formas mais estudadas tanto em condições fisiológicas como patológicas (AZAB *et al.*, 2016). A PGE2 é um mediador lipídico produzido em condições fisiológicas, mas que tem sua produção aumentada quando ocorre uma infecção ou inflamação, e seu acúmulo excessivo no organismo pode provocar imunossupressão intensa, podendo contribuir para a inflamação crônica e potencialmente progredir para diversas patologias, tais como câncer, artrite reumatoide e aterosclerose (FAUDZI *et al.*, 2019).

Os leucotrienos são mediadores lipídicos envolvidos na resposta imune/inflamatória e em várias doenças, como asma e aterosclerose. O leucotrieno B4 (LTB4) é um dos mais potentes fatores quimiotáticos para neutrófilos, exercendo um papel crucial na defesa do hospedeiro contra infecções e na ativação de células envolvidas na imunidade inata. Neutrófilos e monócitos produzem LTB4 e são as principais fontes deste mediador no sangue e no sítio inflamatório (KONIG *et al.*, 2019).

Em relação aos fatores de transcrição atuantes na resposta inflamatória, destaca-se o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), presente em todas as células de mamíferos. Atua regulando a expressão de genes essenciais no processo inflamatório e é ativado através de receptores Toll-like (TLR), que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses receptores são expressos na superfície e no citosol de inúmeras células (REDONDO *et al.*, 2014) e a sinalização de TLRs desencadeia o recrutamento de proteínas, que se ligam a proteínas quinases para finalmente levar à ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B. Estas proteínas são: MyD88, IRAK e TRAF-6 e podem desencadear a ativação das vias JNK e ERK da cascata das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógeno). Isso induz a ativação dos fatores de transcrição AP-1 (ativador proteico-1) e NF-

kB, resultando na expressão de vários genes diretamente envolvidos na produção de citocinas inflamatórias em resposta à infecção. Após ativação de TLRs, também ocorre aumento na expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), que são importantes no início da resposta imune adaptativa e também na produção de citocinas (REDONDO *et al.*, 2014).

A p38 MAPK é uma classe de proteínas-quinases que respondem a estímulos como citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs). Sabe-se que a p38 MAPK possui papel importante na inflamação crônica, o que desencadeou crescente interesse na realização de ensaios pré-clínicos e clínicos para a aplicação de inibidores da p38 MAPK em doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, asma e doenças neurodegenerativas, o que tem sido considerado um potencial alvo terapêutico (KIM & LEE, 2017).

Durante o processo inflamatório, pode ocorrer a formação do inflamassoma, o qual é um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases), sendo uma estrutura essencial no reconhecimento de alterações não fisiológicas. Estas alterações podem ser resultado da presença de produtos microbianos, adjuvantes ou alterações no ambiente iônico intra e extracelular. A participação do inflamassoma é evidente em diversas doenças inflamatórias, tais como choque séptico, artrite reumatoide, dor neuropática crônica, gota e epilepsia, cuja atuação é moldada pelo tipo de ativação e influenciada pelo microambiente. O inflamassoma estabelece um envolvimento estreito com a inflamação patológica, pela ativação de vias intracelulares de morte por apoptose, piroptose e necrose, sendo um alvo potencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças de base inflamatória (PAIVA-OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Diferentes intervenções terapêuticas têm sido avaliadas para tratamento do processo inflamatório, devido à sua complexidade e diversidade de mediadores fisiológicos envolvidos. A maneira mais comum compreende o emprego de inibidores da COX (VANE *et al.*, 1998). Vane e colaboradores, em 1971, identificaram o mecanismo de ação dos medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais clássicos, os quais inibem a produção das prostaglandinas através da inibição da COX-1 e da COX-2.

Outra terapia utilizada para o tratamento de doenças de natureza inflamatória ou autoimune inclui os glicocorticoides, que são hormônios sintetizados e secretados pelo córtex da adrenal. Esta classe de hormônios exerce inúmeras ações fisiológicas no organismo quando disponíveis em concentrações basais. Os glicocorticoides geralmente atuam no

metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e são secretados em maiores quantidades em situações traumáticas e estressantes. Entretanto, quando as concentrações plasmáticas dos glicocorticóides excedem os valores de normalidade, podem induzir distúrbios metabólicos (LONGUI, 2007).

A dexametasona é um anti-inflamatório esteroide amplamente utilizado na prática clínica, indicado para o tratamento de alergias, inflamações e sintomas de diversos tipos de doenças, como problemas reumáticos e artríticos, de pele, nos olhos, glandulares, pulmonares, sanguíneos e gastrintestinais, em adultos e crianças. É um glicocorticoide de ação prolongada, promovendo supressão do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) por 36 a 72 horas (ANTI *et al.*, 2008). A dexametasona sintética é mais potente que o cortisol e não possui atividade mineralocorticoide, o que a torna um fármaco com menos efeitos colaterais (GUYTON & HALL, 2006). Como exemplo, WANG *et al.* (2019) desenvolveram micelas mistas em nanoescala utilizando lecitina de gema de ovo / glicolato de sódio para encapsular o palmitato de dexametasona (DMP-MMs) e realizar o tratamento da artrite reumatoide, exibindo vantagens no alívio da inflamação articular.

A dexametasona possui a capacidade de estabilizar as membranas lisossomais dos leucócitos, diminuindo a concentração de enzimas liberadas e reduzindo a capacidade dos vasos em responder aos estímulos agressivos. Reduz a expressão endotelial das moléculas de adesão intercelular, fato que dificulta a migração leucocitária em circulação (PETTET *et al.*, 1996), e diminui a angiogênese, a síntese de prostaglandinas e leucotrienos por meio do bloqueio da fosfolipase A2, enzima que promove a liberação do ácido araquidônico na lesão celular (MACEDO & OLIVEIRA, 1998).

Porém, os principais efeitos colaterais da utilização de dexametasona incluem aumento de peso, hipertensão, osteoporose, aumento do apetite, dificuldade na cicatrização de feridas, aumento da suscetibilidade para contrair infecções, fraqueza muscular, úlcera gastrintestinal, hiperglicemia e aumento da necessidade de medicamentos para controle da diabetes. Nestes casos, os glicocorticoides apresentam-se como hormônios diabetogênicos, promovendo aumento da produção hepática de glicose e diminuição da captação periférica deste carboidrato nos tecidos muscular, hepático e adiposo (LONGUI, 2007).

Diante de tais considerações, a busca por novas intervenções terapêuticas para tratamento de portadores de doenças inflamatórias tem sido crescente, principalmente incluindo o uso de produtos naturais ou combinação dos mesmos com fármacos, com o

objetivo de diminuir a concentração causadora dos efeitos colaterais. Dentre os produtos naturais que têm sido investigados quanto ao seu potencial efeito anti-inflamatório, destacam-se os produtos elaborados pelas abelhas, tais como própolis e geoprópolis (GEO).

O uso de produtos apícolas no tratamento e alívio de diversos estados patológicos é uma prática que acompanha a humanidade desde a antiguidade. Nas últimas décadas, muitos trabalhos foram publicados para divulgar e revisar as propriedades da própolis produzida por abelhas do gênero *Apis*.

As abelhas sociais pertencem à família Apidae e encontram-se divididas em duas subfamílias: Apinae, com a espécie mais estudada *Apis mellifera* L., e Meliponinae, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão ou meliponíneos (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Os meliponíneos estão distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, já foram identificadas mais de 400 espécies de abelhas nativas, responsáveis pela polinização de grande parte das plantas dos trópicos. O principal interesse na criação de abelhas sem ferrão está no fato de que esta atividade não representa qualquer risco de acidentes com enxames, o que facilita a manipulação bem como a extração de mel e própolis direcionados ao setor comercial (LAVINAS *et al.*, 2019; SOUZA JUNIOR *et al.*, 2019).

As abelhas sociais coletam resinas de diferentes partes de plantas e adicionam secreções mandibulares produzindo a própolis, um material resinoso e balsâmico de composição complexa, contendo 50% de resinas e bálsamos vegetais, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, podendo variar de acordo com a flora da região e subespécie de abelha (BANKOVA *et al.*, 2019).

Diferentemente, para elaboração da geoprópolis, algumas espécies de Meliponinae adicionam terra ou barro à sua composição (LAVINAS *et al.*, 2019; SOUZA; JUNIOR *et al.*, 2019). Neste grupo, encontra-se *Melipona fasciculata* Smith, conhecida popularmente como “a tiúba do Maranhão”, ocorrendo no nordeste da região amazônica, nos estados do Pará, Maranhão e Tocantins (SILVEIRA *et al.*, 2002).

Própolis e geoprópolis são utilizadas para proteger a entrada da colméia, revestir as paredes internas, desinfetar os favos e embalsamar insetos mortos, para manter o ambiente interno asséptico, o que está relacionado com a sua comprovada atividade antimicrobiana (GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998; SALATINO *et al.*, 2005).

A partir de trabalhos publicados nas últimas décadas, a própolis produzida por *Apis*

*mellifera* vem demonstrando uma gama imensa de propriedades biológicas, tais como imunomoduladora (ORSI *et al.*, 2000; SFORCIN, 2007), antitumoral (ORSOLIC & BASIC, 2005), antimicrobiana (MOHAMMADZADEH *et al.*, 2007; LIBÉRIO *et al.*, 2009), antifúngica (MURAD *et al.*, 2002), antioxidante (AHN *et al.*, 2004), hepatoprotetora (BHADAURIA *et al.*, 2008), anti-inflamatória, anestésica, cicatrizante (DOBROWOLSKI *et al.*, 1991), dentre outras.

As atividades biológicas da própolis de *A. mellifera* são atribuídas a diversas classes de compostos químicos, principalmente dos ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos (MENEZES, 2005). Porém, essa composição varia de acordo com condições geográficas e origem botânica, havendo maior variabilidade de compostos quando a própolis pertence a regiões tropicais, onde há maior diversidade florística (BANKOVA *et al.*, 2000).

ASGHARPOUR *et al.* (2019) investigaram os efeitos antioxidantes e imunomoduladores do extrato de própolis em macrófagos murinos (RAW 264.7), observando inibição da proliferação celular e redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e NO. Além disso, a expressão de COX-2, IL-1 $\beta$  e IL-6 diminuiu significativamente e tais achados sugeriram os efeitos anti-inflamatórios da própolis.

SILVA *et al.* (2017) demonstraram o potencial anti-inflamatório da própolis vermelha brasileira, verificando inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da expressão de genes relacionados ao sistema complemento e à migração de neutrófilos e macrófagos. Este trabalho demonstrou que a própolis vermelha pode ser tão efetiva quanto a dexametasona, mas atuando por diferentes mecanismos de ação.

Com relação à geoprópolis, há relatos de sua utilização empiricamente no tratamento de doenças respiratórias, do trato digestivo, dermatoses e na melhoria do sistema imunológico (FREITAS *et al.*, 2008; JÚNIOR *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2018). Sua composição química também pode variar de acordo com a localização geográfica, flora local, clima, espécies de abelhas, o que pode influenciar suas propriedades biológicas (FERREIRA *et al.*, 2019). Os principais compostos isolados da geoprópolis foram, ácidos graxos, ácidos orgânicos, açúcares, álcoois, esteroides, além de compostos polifenólicos, triterpenos e saponina (SOUZA *et al.*, 2017; DUTRA *et al.*, 2019; SOUZA JUNIOR *et al.*, 2019). Os polifenóis são os principais compostos relacionados à ação anti-inflamatória, além de agirem também como anticarcinogênicos e prevenirem doenças degenerativas, disfunções neurológicas, entre outras (FERREIRA *et al.*, 2019).

A geoprópolis tem sido investigada quanto às suas propriedades antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, imunomoduladora e gastroprotetora (SANTOS *et al.*, 2017; DUTRA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2019). Contudo, ainda são escassos os estudos sobre as atividades farmacológicas da geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata*, criada há séculos no Estado do Maranhão pela população indígena para produção de mel. Atualmente, são criadas comercialmente em agrupamentos de colônias, denominados meliponários (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Desde 2003, pesquisadores da área de Produtos Naturais das Universidades Federal e Estadual do Maranhão analisaram algumas de suas atividades biológicas, bem como a sua composição química. GOMES (2005) estudou a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da geoprópolis de tíuba. DUAİLIBE *et al.* (2007) observaram o efeito do bochecho com extrato alcoólico de geoprópolis no número de colônias de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes, atuando como auxiliar no tratamento e na prevenção da cárie. ASSUNÇÃO (2009) evidenciou que o extrato hidroalcoólico de geoprópolis apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. ARAÚJO (2009) analisou os efeitos da administração aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de geoprópolis em camundongos, observando sua baixa toxicidade quando utilizado oralmente, em doses únicas e altas, e toxicidade hepática em tratamentos subcrônicos.

Em 2010, uma doutoranda (Maria José Abigail Mendes Araújo) trouxe amostras de geoprópolis produzidas no Maranhão ao nosso laboratório, iniciando assim os estudos deste produto em nosso grupo e investigando sua ação antimicrobiana, imunomoduladora e citotóxica contra células HEp-2. Esta amostra foi analisada quimicamente, revelando que seus principais compostos são lupeol, amirinas, ácido anacárdico, dentre outros (ARAÚJO *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho foi delineado visando avaliar o possível sinergismo entre a geoprópolis e o fármaco anti-inflamatório dexametasona. A hipótese deste projeto é que a interação entre a geoprópolis e menores concentrações de dexametasona não é tóxica para monócitos humanos e exerce ação anti-inflamatória mais eficiente do que a dexametasona isoladamente. Assim, consideramos justificável a proposta de avaliar os efeitos da geoprópolis em conjunto com a dexametasona sobre estas células, podendo culminar em achados que possam favorecer o tratamento de doenças inflamatórias.

Considerando o consumo de produtos apícolas e meliponícolas por via oral e a distribuição sistêmica de anti-inflamatórios, foram avaliadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC, na sigla em inglês), que são células circulantes e amplamente utilizadas em ensaios de imunomodulação e imunofarmacologia.

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Avaliar o possível efeito citotóxico e imunomodulador da combinação geoprópolis + dexametasona sobre PBMCs humanas, através da avaliação de vias de sinalização, produção de citocinas e eicosanóides.

### **Objetivos específicos:**

- Verificar o possível efeito citotóxico da geoprópolis associada ou não à dexametasona sobre PBMCs humanas;
- Avaliar, se houver morte, e o tipo de morte após o tratamento com geoprópolis associada ou não à dexametasona, por citometria de fluxo;
- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e aquelas envolvidas no inflamassoma (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-18 e IL-33) por ensaio imunoenzimático (ELISA), após incubação de PBMCs com geoprópolis associada ou não à dexametasona;
- Avaliar a produção de prostaglandina E2 e leucotrieno B4, por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Avaliar as vias intracelulares do NF-kB e p38 MAPK por RT-qPCR.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CAAE: 35248620.0.0000.5411).

#### 3.1. Obtenção das amostras de geoprópolis

A geoprópolis foi produzida por *Melipona fasciculata* Smith, a partir de colmeias localizadas no município de Palmeirândia (2° 39' S, 44° 55' O), pertencente à microrregião da baixada ocidental maranhense. Esta amostra de geoprópolis apresenta como principais características organolépticas: fragmentos duros, grânulos de consistência heterogênea, aroma inodoro, cor marrom escura e sabor amargo (CUNHA *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2008). A geoprópolis foi coletada com auxílio de espátulas esterilizadas e mantida a -20 °C até o momento de preparo do extrato.

#### 3.2. Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e da solução de dexametasona

A amostra de geoprópolis (30 g) foi triturada, macerada e extraída em 100 mL de etanol 70%, a temperatura ambiente e sob moderada agitação. Após 24 h, o material foi filtrado e a concentração final foi calculada, obtendo-se o peso seco do extrato hidroalcoólico de geoprópolis (11 mg/mL). O extrato final de geoprópolis foi utilizado na concentração de 50 µg/mL e diluído em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) completo, suplementado com soro fetal bovino (10%).

A dexametasona (DEX – 25 mg) foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e diluída em 10 mL de etanol absoluto e 10 mL de RPMI. A concentração utilizada foi de 50 µM.

A combinação de GEO com DEX foi obtida utilizando 25 µg/mL e 25 µM de cada tratamento, respectivamente.

Outras concentrações de GEO e DEX também foram analisadas em experimentos-

piloto e, a partir dos melhores resultados obtidos, foram adotadas as concentrações descritas acima.

### **3.3. Obtenção de PBMCs humanas**

O sangue foi obtido de 5 indivíduos voluntários saudáveis, que assinaram um termo de consentimento para doação de sangue dando ciência desta pesquisa (Anexo 1). Foram aceitos indivíduos acima de 18 anos, não fumantes e que não estivessem utilizando medicação de espécie alguma. Tais indivíduos foram informados desta pesquisa através de cartazes afixados nos murais do Instituto de Biociências, e participaram desta pesquisa somente aqueles que tiveram interesse por livre e espontânea vontade.

Amostras de sangue (20 mL) foram coletadas e colocadas em tubos Falcon estéreis contendo 200  $\mu$ L de heparina. Posteriormente, as PBMCs foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, UK), através de centrifugação e o anel rico em células mononucleares foi coletado e lavado 2 vezes em meio RPMI por 10 minutos a 1200 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células ressuspendido em 1 mL de meio RPMI + 10% de soro fetal bovino). A identificação de células viáveis e contagem foram realizadas através da incorporação de azul tripan durante 8 minutos a 37 °C, e ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL para a realização dos experimentos.

As culturas celulares foram incubadas em meio RPMI completo e ativadas por lipopolissacarídeo (LPS – 1  $\mu$ g/mL) por 2 h. Posteriormente, as células foram incubadas com GEO, DEX, ou GEO+DEX por 22 h. A adição destas variáveis à cultura de PBMCs previamente incubadas com LPS representa um modelo passível de verificar o papel terapêutico/protetor das mesmas, simulando o tratamento de uma condição inflamatória (BACHIEGA *et al.*, 2012).

### **3.4. Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT (3(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio – Sigma-Aldrich, EUA). O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da

mitocôndria a formazan. Após incubação das culturas celulares com os diferentes tratamentos por 22 h, a placa foi centrifugada por 10 min a 1500 rpm e o sobrenadante foi removido, em seguida foram adicionados 300 µL de MTT (1 mg/mL) dissolvido em meio RPMI completo, seguido de posterior incubação a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> por 3 h. Após este período, a placa foi centrifugada por 10 min a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade ótica (D.O.) em leitor de ELISA com filtro de 540 nm e calculadas as porcentagens de viabilidade celular. Os resultados foram expressos em relação ao controle, considerado como 100%.

### **3.5. Análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo**

Para análise do possível tipo de morte celular, PBMCs humanas ( $1 \times 10^5$  células) foram adicionadas aos poços de uma placa de 24 poços. As células foram tratadas com GEO, DEX e sua associação por 24 h. Como grupo controle, foram utilizadas células cultivadas em meio de cultura suplementado de soro fetal bovino. Para cada teste, foi utilizado um tubo controle (autofluorescência), no qual as células não foram marcadas, e tubos com células mortas para controle de morte (não marcado, marcado com anexina V, marcado com iodeto de propídio (PI) e marcado com anexina V + PI).

Após o período de tratamento, as células foram coletadas e transferidas paratubos de citometria. As células foram centrifugadas a 405 g por 10 minutos e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão rico em cálcio para marcação com anexina V (conjugada a FITC) e iodeto de propídio (Santa Cruz – Biotechnology, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

As análises foram realizadas em citômetro modelo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences, EUA), e analisadas pelo software FlowJo vX0.7, sendo adquiridos 30.000 eventos. Para apresentação dos dados, determinamos as porcentagens de células vivas (Anexina V -, PI -), células em apoptose inicial (anexina V +, PI -) e apoptose tardia ou necrose (anexina V +, PI +).

### 3.6. Avaliação de vias intracelulares por RT-qPCR

O RNA total foi extraído pelo método baseado em TRIzol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, EUA). Posteriormente, a integridade e a concentração de RNA foram medidas espectrofotometricamente, utilizando o leitor de microplaca Multi-Mode HTX com acessórios para placas Take-Trio Micro-Volume (BioTek, EUA).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando um sistema de PCR em tempo real QuantStudio® 3 para avaliar as alterações na expressão do mRNA nos genes mencionados na Tabela 1. O RNA total foi extraído das células com Reagente Ambion TRIzol (Life Sciences – Fisher Scientific Inc, EUA) e tratados com Dnase I (Invitrogen, EUA). A síntese de cDNA foi realizada com Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O qPCR foi realizado em um total de 10 µl, contendo PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x (5 µl) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,4 µM de cada iniciador, 100 ng de cDNA e H<sub>2</sub>O livre de nuclease. As expressões relativas foram analisadas pelo método CT comparativo ( $\Delta\Delta C_t$ ), normalizados pela expressão de GAPDH e 18S e comparando as condições estáticas como referência.

**Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados na expressão gênica e condições do ciclo de PCR.**

Gene (ID)	Primer	5'- 3' Sequência	Condições da reação
NF- $\kappa$ B (4790)	<i>Forward</i>	CAC CTG TTC CAA AGA GCA CC	95 °C – 15s; 59 °C– 30s; 72 °C– 30s
	<i>Reverse</i>	G GTT CAG GAG CTG CTG AAA C	
p38 MAPK (5594)	<i>Forward</i>	GAG AAC TGC GGT TAC TTA	95 °C – 15s; 59 °C– 30s; 72 °C– 30s
	<i>Reverse</i>	ATG GGT CAC CAG ATA CAC AT	
GAPDH (2597)	<i>Forward</i>	GAC TCA TGA CCA CAG TCC ATG C	95 °C – 15s; 65 °C– 30s; 72 °C– 30s
	<i>Reverse</i>	AGA GGC AGG GAT GAT GTT CTG	
18S (106632259)	<i>Forward</i>	TGC CAG AGT CTC GTT CGT TAT CG	95 °C – 15s; 60 °C– 30s; 72 °C– 30s
	<i>Reverse</i>	CGG ACA GGA TTG ACA GAT TGA TAG C	

### 3.7. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA

A determinação da concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-18 e IL-33 foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Inicialmente, foram adicionados 100  $\mu$ L de salina tamponada com fosfato (PBS) e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R & D Systems, EUA) às placas (Maxisorp Nunc, EUA), e incubadas *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Após 3 lavagens dos poços com PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), ocorreu o bloqueio dos poços com 300  $\mu$ L de 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, nova sequência de lavagens foi realizada e foram adicionadas alíquotas de 100  $\mu$ L dos sobrenadantes das culturas celulares incubadas com os tratamentos com posterior incubação por 2 h a temperatura ambiente. Após esse período, os poços foram novamente lavados e foram adicionados 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção policlonal, seguido de nova incubação por 2 h a temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 100  $\mu$ L do conjugado estreptoavidina-peroxidase, incubando-se por 20 minutos ao abrigo de luz. Novas lavagens foram realizadas e, para revelação, foram adicionados 100  $\mu$ L da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB). Após 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 490 nm.

### 3.8. Dosagem de eicosanoides

A determinação de prostaglandina E2 e leucotrieno B4 também foi realizada pelo método de ELISA utilizando kits da Elabscience (Houston, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.9. Análise estatística**

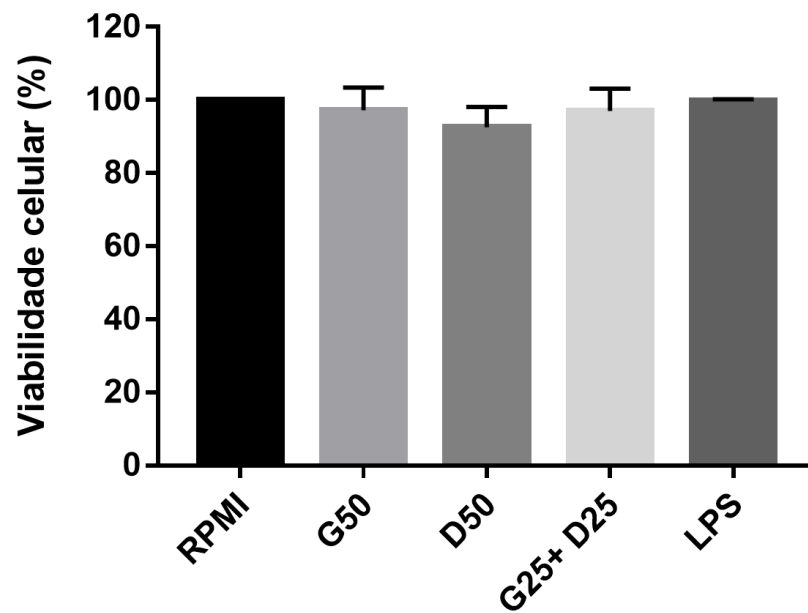
A análise dos resultados foi realizada através do software GraphPad Prism 7 (GraphPad, USA), utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett ( $P < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Viabilidade celular

A fim de verificar um possível efeito citotóxico dos tratamentos estudados e de sua combinação, foi analisada a viabilidade celular pelo método da redução do MTT, após incubação de PBMCs com a geoprópolis e dexametasona isoladamente e em associação, após 24 h (figura 1).

Conforme observado, nenhum dos tratamentos apresentou citotoxicidade sobre as células, sendo a viabilidade  $\geq 90\%$ .

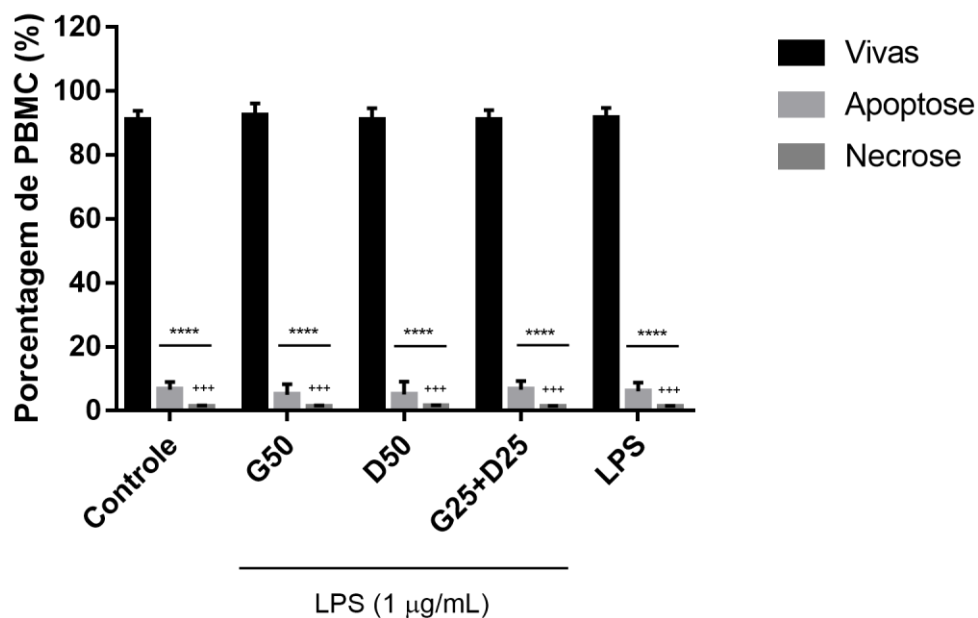


**Figura 1.** Viabilidade (%) de PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (controle), geoprópolis (G – 50  $\mu\text{g/mL}$ ), dexametasona (D – 50  $\mu\text{M}$ ) e associação (G25 + D25) após 22 h. Os dados representam a média e desvio-padrão ( $n=5$ ) ( $P > 0,05$ ).

#### 4.2. Apoptose e necrose por citometria de fluxo

Para avaliar o possível tipo de morte celular de PBMCs após incubação com os tratamentos, foi realizada a análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo (figura 2).

Conforme observado, os tratamentos isolados e em combinação apresentaram uma baixa porcentagem de morte por apoptose e necrose ( $P < 0,0001$ ) em relação às células vivas, havendo predominância de apoptose em relação à necrose ( $P < 0,001$ ).



**Figura 2.** Morte celular (%) de PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (controle), geoprópolis (G – 50 µg/mL), dexametasona (D – 50 µM) e associação (G25 + D25) após 24 h, na presença de LPS (1 µg/mL). Os dados representam a média e desvio-padrão (n=5). Significativamente diferente do controle \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Significativamente diferente de apoptose: +++ ( $P < 0,001$ ).

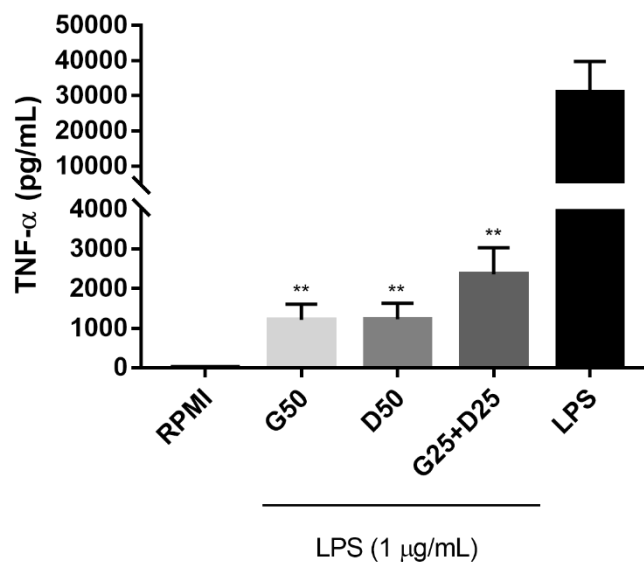
#### 4.3. Avaliação de vias intracelulares

Os efeitos da GEO, DEX e sua combinação foram avaliados sobre as vias intracelulares do NF- $\kappa$ B e p38 MAPK. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que tanto os tratamentos isolados como em associação não afetaram biológica e significativamente as vias estudadas, apresentando elevado desvio-padrão (dados não mostrados).

#### 4.4. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA

Com o intuito de observar o efeito dos tratamentos nas funções de PBMCs, foi avaliada a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, bem como aquelas envolvidas na ativação do inflamassoma.

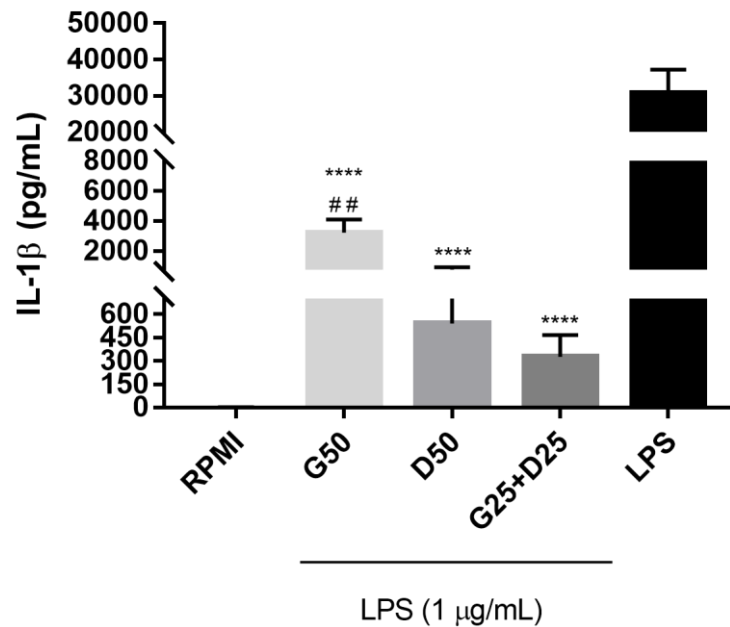
Na figura 3 estão apresentados os resultados da produção de TNF- $\alpha$  por PBMCs tratadas com GEO e/ou DEX, na presença de LPS. Conforme observado, a GEO (50  $\mu$ g/mL) e a DEX (50  $\mu$ M) isoladamente, bem como a combinação (G25+D25), inibiram a produção desta citocina em relação ao LPS ( $P < 0,05$ ), não havendo diferença estatística entre os tratamentos isoladamente e em combinação.



**Figura 3.** Produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (controle), geoprópolis (G – 50  $\mu$ g/mL), dexametasona (D – 50  $\mu$ M) e associação (G25 + D25) após 24 h na presença de LPS (1  $\mu$ g/mL). Significativamente diferente do LPS: \*\*

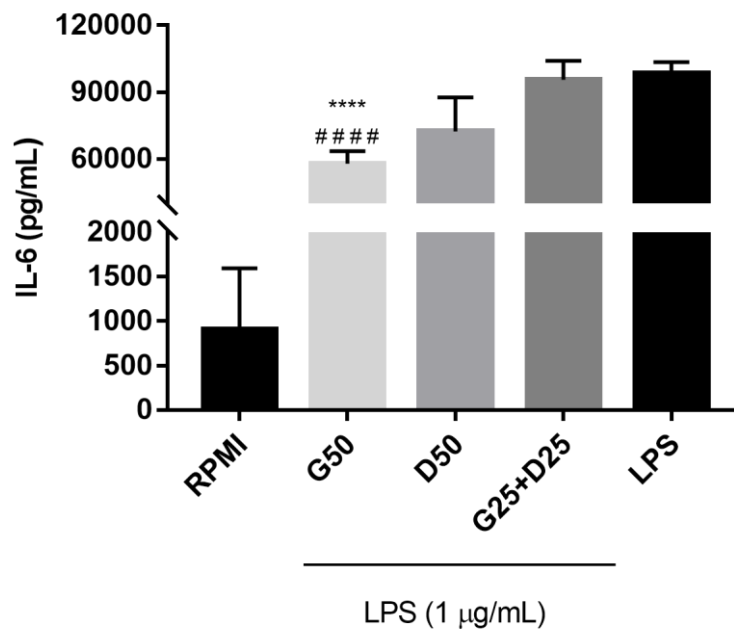
( $P < 0,01$ ). Significativamente diferente de G25+D25: # ( $P < 0,05$ ).

Na figura 4 estão apresentados os resultados da produção de IL-1 $\beta$ . A GEO e a DEX inibiram sua produção por PBMCs; contudo, a associação induziu maior inibição em relação à GEO isoladamente ( $P < 0,05$ ).



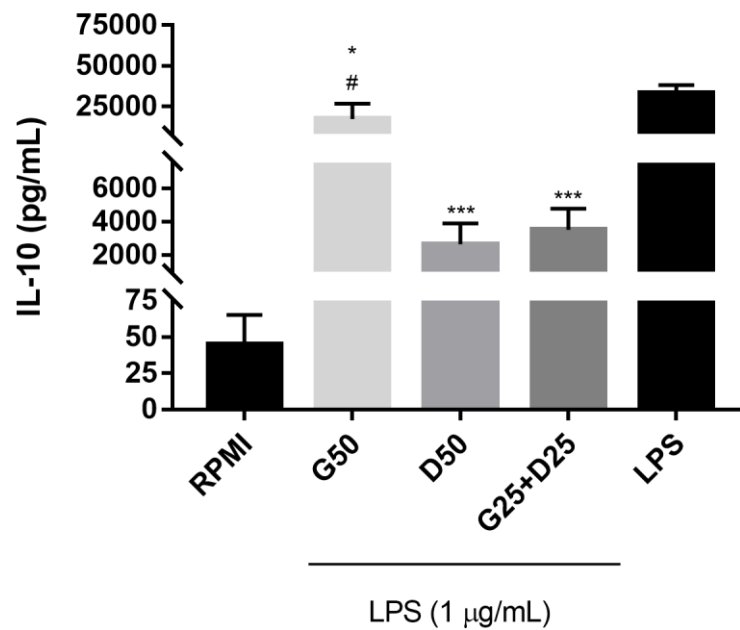
**Figura 4.** Produção de IL-1 $\beta$  (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (controle), geoprópolis (G – 50  $\mu$ g/mL), dexametasona (D – 50  $\mu$ M) e sua associação (G25 + D25) após 24 h na presença de LPS (1  $\mu$ g/mL). Significativamente diferente do LPS: \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Significativamente diferente De G25+D25: ## ( $P < 0,01$ ).

Os resultados referentes à produção de IL-6 por PBMCs tratadas com GEO e/ou DEX, na presença de LPS, estão apresentados na figura 5. A GEO isoladamente inibiu a produção desta citocina em relação ao estímulo do LPS ( $P < 0,05$ ). No entanto, a DEX e a combinação não apresentaram alterações significativas.



**Figura 5.** Produção de IL-6 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (controle), geoprópolis (G – 50 µg/mL), dexametasona (D – 50 µM) e associação (G25 + D25) após 24 h na presença de LPS. Significativamente diferente de LPS: \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). Significativamente diferente de G25+D25: ##### ( $P < 0,0001$ ).

A produção de IL-10 por PBMCs tratadas com GEO e/ou DEX, na presença de LPS, está apresentada na figura 6. Houve diminuição significativa na produção desta citocina quando as células foram incubadas com os tratamentos. A DEX e a associação apresentam diminuição significativamente maior quanto à produção de IL-10 em relação à GEO.



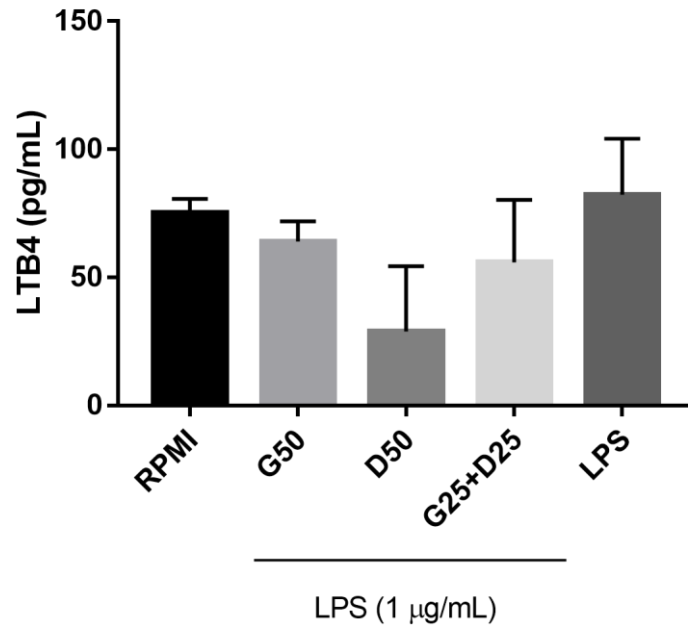
**Figura 6.** Produção de IL-10 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (controle), geoprópolis (G – 50 µg/mL), dexametasona (D – 50 µM) e sua associação (G25 + D25) após 24 h na presença de LPS (1 µg/mL). \* ( $P < 0,05$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ): significativamente diferente do LPS. # ( $P < 0,05$ ): significativamente diferente de G25+D25.

Neste trabalho, foi realizada também a dosagem de IL-18 e IL-33 pela técnica de ELISA, porém não foi possível detectar a produção das mesmas, talvez pela sensibilidade do kit de ELISA ou por conta da diluição das amostras, para determinação das demais citocinas.

#### 4.5. Determinação de eicosanóides pela técnica de ELISA

Para avaliar o efeito dos tratamentos nas funções de PBMCs, quanto a produção de eicosanóides, foi avaliada a produção de prostaglandina E2 e leucotrieno B4.

A produção de LTB<sub>4</sub> por PBMCs tratadas com GEO e/ou DEX, na presença de LPS, está apresentada na figura 7. Não houve diferença significativa na produção deste eicosanoide quando as células foram incubadas com os tratamentos e suas combinações.



Embora não significativamente, a DEX diminuiu a produção deste metabólito ( $P > 0,05$ ).

**Figura 7.** Produção de leucotrieno B<sub>4</sub> (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (controle), geoprópolis (G – 50 µg/mL), dexametasona (D – 50 µM) e sua associação (G25 + D25) após 24 h na presença de LPS ( $P > 0,05$ ).

Neste trabalho, foi realizada também a dosagem de prostaglandina E<sub>2</sub> pela técnica de ELISA, porém não foi detectada a produção da mesma, talvez pela sensibilidade do método.

## 5. DISCUSSÃO

A resposta inflamatória compreende um conjunto de eventos que ocorrem em resposta a presença de um agente agressor ou lesão tecidual. Diversas células estão ativamente envolvidas na resposta inflamatória, tais como os neutrófilos, basófilos, mastócitos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, linfócitos T e B e células *natural killer* (MOORE *et al.*, 2001). Os tipos celulares escolhidos para serem avaliados neste trabalho foram as PBMCs, que incluem 80% de linfócitos T e B, 10% de células *natural killer* e 10% de monócitos (DAVILA *et al.*, 2019).

A viabilidade de PBMCs foi inicialmente analisada pelo método da redução do MTT após 24 h de incubação das células na presença de GEO e DEX isoladamente e em associação.

Os resultados demonstraram que os tratamentos não apresentaram ação citotóxica sobre PBMCs, o que está de acordo com trabalhos anteriores de nosso grupo, sendo mantido  $\geq 90\%$  de viabilidade (ARAÚJO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2019). As concentrações de GEO utilizadas no presente estudo foram adotadas de acordo com resultados anteriores de nosso grupo. ARAÚJO *et al.* (2015) e OLIVEIRA *et al.* (2019) avaliaram a viabilidade celular após incubação de células aderentes obtidas de PBMCs com a mesma amostra, relatando ausência de efeito citotóxico da GEO, além de demonstrar que o seu solvente – etanol 70% também não apresentou efeito citotóxico. OLIVEIRA *et al.* (2016) também relataram ausência de citotoxicidade da GEO sobre células THP-1, uma linhagem celular utilizada nos ensaios imunológicos mimetizando monócitos humanos.

No presente estudo, foi observado que a DEX não induziu ação citotóxica. A DEX também não apresentou citotoxicidade sobre a linhagem celular progranulocítica humana HL60, células-tronco mesenquimais, hepatócitos e células THP-1, utilizando concentrações menores que a de nosso trabalho até 100  $\mu\text{M}$  (CRABTREE *et al.*, 1979; NUZZI *et al.*, 2012).

Portanto, para refinar esses resultados obtidos, demos continuidade ao próximo experimento, avaliando, por citometria de fluxo, o possível tipo de morte celular (apoptose

e/ou necrose) após incubação de PBMCs por 24 h com os tratamentos. A GEO e a DEX isoladamente ou em combinação induziram baixas porcentagens de apoptose e necrose, sendo a apoptose mais presente do que necrose.

Em estudos anteriores do nosso grupo, BARTOLOMEU *et al.* (2016) relataram que a GEO (25 µg/ml) e um quimioterápico (doxorubicina - 1 µM) isoladamente induziram apoptose em células HEp-2 após 72 h e, em associação, essa porcentagem foi ainda maior. Estes achados são relevantes, demonstrando o caráter seletivo da GEO sobre células tumorais, mas não sobre células envolvidas na resposta imune.

No processo inflamatório, há uma ampla variedade de mediadores envolvidos, tais como as citocinas, que são glicoproteínas secretadas por diferentes células e que possuem inúmeras funções, atuando na resposta a infecções, em processos inflamatórios, regenerativos, na regulação do metabolismo e da resposta imune, podendo também regular a proliferação e diferenciação celular (SCHELLER *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-6 foi analisada após incubação de PBMCs humanas por 2 h na presença de LPS, seguido de incubação com os tratamentos GEO e DEX isoladamente e em associação por mais 22 h de incubação. Esse protocolo mimetiza um possível tratamento de uma condição inflamatória, nesse caso desencadeada pelo LPS, para observar uma possível intervenção terapêutica após incubação com as variáveis estudadas.

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos, monócitos e linfócitos, e sua função principal está mais associada à mediação de respostas inflamatórias, induzindo a produção de outras citocinas e a expressão de moléculas de adesão para recrutamento de leucócitos, do que somente com a vigilância imune de neoplasias (PALATA *et al.*, 2019). Assim, o interesse clínico nessa citocina é direcionado às doenças inflamatórias e autoimunes, pois a produção exarcebada de TNF- $\alpha$  é indutora da inflamação crônica e sua inibição pode ser eficaz no quesito terapêutico (AGGARWAL, 2012).

Nossos resultados demonstraram que, na presença do LPS, a GEO apresentou ação inibitória na produção de TNF- $\alpha$  por PBMCs. Em contrapartida, estudos anteriores do nosso grupo, relataram aumento na produção de TNF- $\alpha$  por monócitos e células THP-1 incubados com 25 µg/mL de GEO (ARAÚJO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Em outro trabalho também do nosso grupo, a GEO associada a um quimioterápico

(doxorubicina) também induziu aumento da produção de TNF- $\alpha$  por monócitos na presença de LPS (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Visto que a GEO apresenta constituintes anti-inflamatórios que contribuem com a inibição de algumas citocinas inflamatórias, FRANCHIN *et al.*, (2016) verificaram que o composto cinamoiloxi-mammeisina (CNM) induziu redução na liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos RAW 264.7 estimulados com peptidoglicano ou LPS.

*In vivo*, FRANCHIN *et al.* (2012) avaliaram o efeito da administração de extrato etanólico de GEO produzida por abelhas da espécie *Melipona scutellaris* e sua fração aquosa na dose de 30 mg/kg, demonstrando redução significativa na produção de TNF- $\alpha$  por células de tecido plantar da pata de camundongos que receberam injeção de carragenina.

Assim, nossos resultados sugerem que a ação da GEO sobre a produção de TNF- $\alpha$  é dependente não só da concentração utilizada, mas também dos tipos celulares adotados e do modelo estudado. Ademais, diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* podem culminar em resultados diferentes, dependendo das condições experimentais. Estas informações reforçam a necessidade de padronização das condições experimentais por todos os pesquisadores, para favorecer a comparação e sistematização de dados obtidos com a GEO, permitindo estabelecer comparações e indicações deste produto.

Com relação à DEX, seu mecanismo de ação inclui a inibição da produção de mediadores, como as citocinas pró-inflamatórias. Conforme esperado, o tratamento de PBMCs com DEX induziu ação inibitória significativa sobre a produção de TNF- $\alpha$  em nosso trabalho.

A combinação GEO + DEX também apresentou ação inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$ , porém não houve diferença significativa em relação às variáveis isoladamente.

A GEO e a DEX também inibiram a produção de IL-1 $\beta$  em nosso trabalho, porém a combinação GEO + DEX apresentou maior inibição, entretanto sem diferença estatística em relação à GEO isoladamente. Embora não significativa, tal ação inibitória da combinação tem sua importância biológica e merece ser considerada.

OLIVEIRA *et al.* (2019) relataram a ausência de alterações na produção de IL-1 $\beta$  por monócitos, após incubação com a GEO. Porém, em nosso trabalho, a GEO inibiu a produção de IL-1 $\beta$ , o que sugere seu potencial anti-inflamatório em PBMCs.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória da família IL-1 e pode ser produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais ativadas durante a lesão tecidual. Apresentando função semelhante à do TNF- $\alpha$ , ela é igualmente importante na resposta a estímulos inflamatórios, agindo de forma sinérgica com o TNF- $\alpha$  na imunidade inata e na ativação celular (ZHANG *et al.*, 2007).

GOVERNA *et al.* (2019) investigaram a atividade anti-inflamatória da própolis de álamo comparada ao anti-inflamatório flurbiprofeno, ambos na concentração de 1, 5 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , sobre PBMCs estimuladas por LPS. Os dados obtidos revelaram que tanto a própolis quanto o flurbiprofeno induziram aumento na produção de IL-1 $\beta$ , em comparação ao controle. Em contrapartida, BACHIEGA *et al.* (2012) observaram inibição significativa na produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos murinos estimulados por LPS e incubados posteriormente com própolis e alguns de seus componentes isolados. *In vivo*, FRANCHIN *et al.* (2012) verificaram que a administração de GEO inibiu a produção de IL-1 $\beta$  por células do tecido plantar da pata de camundongos que receberam injeção de carragenina.

No presente estudo, a produção de IL-6 só foi inibida levemente pela GEO, não havendo alteração significativa acarretada pelos demais tratamentos. A IL-6 é uma citocina secretada por muitos tipos celulares, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, hepatócitos e células da glia, e sua produção pode ser estimulada por citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . É uma citocina que atua tanto na imunidade inata, como pró-inflamatória, mediando a produção de neutrófilos e de proteínas de fase aguda, como na imunidade adaptativa, onde atua na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (YOON *et al.*, 2009; KUROWSKA *et al.*, 2020; HUNGNESS *et al.*, 2000).

Trabalhos anteriores do nosso grupo também apontaram que a GEO apresenta um potencial anti-inflamatório com relação à produção de IL-6 por células THP-1 e monócitos humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A produção em excesso da IL-6 está relacionada a diversos processos patológicos crônicos, como doenças cardiovasculares, neurológicas e depressão (HOWREN *et al.*, 2009). Considerando essa informação, a ação inibitória da GEO sugere um potencial efeito terapêutico, o que merece ser melhor investigado em ensaios pré-clínicos e clínicos.

Por outro lado, a IL-10 pode atuar na inibição ou diminuição na produção de IL-6 por PBMCs e mastócitos (MOORE *et al.*, 2001). A IL-10 é uma citocina de amplo envolvimento na inflamação por possuir caráter anti-inflamatório, sendo produzida por

diversas células, tais como linfócitos B, linfócitos T, monócitos, neutrófilos, células NK e células dendríticas (SARAIVA *et al.*, 2020). Sua principal função é a inibição de genes e mediadores pró-inflamatórios, evitando respostas imunológicas exacerbadas (ALTER *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 2020).

A DEX apresentou ação inibitória na produção de IL-10, assim como inibiu a produção das demais citocinas.

Por outro lado, embora a GEO tenha inibido significativamente a produção de IL-10 por PBMCs em relação ao LPS, a mesma manteve os níveis de IL-10 mais elevados, o que é interessante neste contexto de estímulo de PBMCs com LPS adotado em nosso trabalho, favorecendo o ambiente anti-inflamatório.

Em estudos anteriores do nosso grupo, foi observado que a produção de IL-10 aumentou após a incubação de monócitos e células THP-1 com a mesma amostra de GEO, na concentração de 25 µg/mL, sugerindo seu perfil ativador (ARAÚJO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Contudo, estes trabalhos avaliaram a produção de IL-10 sem o estímulo do LPS.

A combinação GEO + DEX também apresentou ação inibitória sobre a produção de IL-10.

Tomados em conjunto, quando observamos a ação da combinação de GEO + DEX, nota-se que houve uma inibição na produção de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-1 $\beta$ . No entanto, esta ação inibitória nem sempre foi mais eficiente do que GEO e DEX isoladamente. Contudo, vale ressaltar que, embora a combinação não tenha sido sempre mais eficiente do que as variáveis isoladas, foi utilizada menor concentração de DEX, o que é relevante e merece maiores investigações em ensaios pré-clínicos, visando minimizar custos e efeitos colaterais.

Para avaliar o efeito da GEO e DEX isoladamente e em combinação sobre a função de PBMCs, foi avaliada também a produção de metabólitos do ácido araquidônico (leucotrieno B4 e prostaglandina E2). Não houve alterações na produção de LTB4 após incubação com as variáveis. A DEX inibiu a produção deste mediador pró-inflamatório não significativamente. A produção de PGE2 não foi detectada, provavelmente devido à sensibilidade do método.

Para avaliar melhor a ação da GEO e da DEX no processo inflamatório se faz

necessário entender o mecanismo de ação a nível intracelular, pois a produção das citocinas avaliadas no presente trabalho é dependente de diferentes vias intracelulares. Assim, foram escolhidos dois dos possíveis alvos para a ação dos tratamentos e sua associação: a via do NF- $\kappa$ B e a p38 MAPK. Entretanto, tanto os tratamentos isolados como a associação não afetaram estas duas vias, além ser observado elevado desvio-padrão.

O NF- $\kappa$ B é um complexo formado por subunidades que encontram-se sob a forma de dímeros ligados a proteína I $\kappa$ B no citoplasma, RelA e p50. É responsável por regular uma variedade de genes envolvidos na resposta imunológica e nos processos inflamatórios (LI *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2017 ). Essa via está também intimamente relacionada com a produção das citocinas avaliadas anteriormente neste trabalho; no entanto, não foi possível correlacionar a produção de citocinas com esta via do NF- $\kappa$ B.

Em dados encontrados anteriormente por nosso grupo, OLIVEIRA e colaboradores (2019) ao avaliarem a expressão de NF- $\kappa$ B por monócitos tratados com GEO, observaram aumento na ativação desse fator de transcrição e níveis levemente menores de I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada. FRANCHIN *et al.*, (2016) demonstraram que a CNM isolada da GEO reduz a atividade de NF- $\kappa$ B, mas não a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  ou translocação de p65 para o núcleo, em macrófagos RAW 264.7, o que sugere que a inibição de ERK 1 / 2 e p38 MAPK causada pela CNM esteja interferindo na ativação de NF- $\kappa$ B.

A via MAPK compreende uma cascata complexa de proteínas e regula processos fisiológicos celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose, e também está associada à indução de moléculas inflamatórias, como COX-2 e iNOS, sendo a p38 MAPK muito importante na regulação de mediadores inflamatórios (YU *et al.*, 2021). FRANCHIN *et al.* (2016) demonstraram que a CNM isolada da GEO reduziu a atividade da p38 MAPK em células RAW 264.7.

Tomados em conjunto, nossos dados indicaram que as vias intracelulares analisadas praticamente não foram afetadas, enquanto a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias foi inibida pelos tratamentos. Pode-se especular que isso possa ter ocorrido em virtude da cinética de expressão e produção terem ocorrido em períodos de tempo diferentes. A combinação GEO + DEX parece promissora, tendo inibido a produção das citocinas avaliadas, mesmo não sendo sempre significativamente diferente das variáveis isoladas. Entretanto, novos estudos merecem ser realizados para explorar melhor estes achados, visto que a combinação inclui menor concentração de DEX, o que pode ser

relevante em ensaios pré-clínicos e clínicos.

## 6. CONCLUSÃO

Os dados preliminares obtidos quanto a ação anti-inflamatória da GEO permitiram concluir que tanto a GEO como a DEX isoladamente ou em combinação não são citotóxicas para PBMCs. Além disso, os tratamentos apresentam ação imunomoduladora sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 por PBMCs. Os tratamentos não induziram alterações biologicamente relevantes quanto às vias intracelulares avaliadas e quanto à produção de LTB<sub>4</sub>.

Assim, apesar de nem sempre se mostrar mais eficiente do que os tratamentos isolados, a combinação GEO + DEX parece promissora e sua utilização permitiria uso da DEX em menores concentrações, diminuindo os efeitos adversos causados pelo tratamento contínuo com este anti-inflamatório, principalmente em células envolvidas na resposta imune.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B.B.; GUPTA, S.C.; KIM, J.H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **Blood**, v. 119, p. 651-65, 2012.
- AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7286-92, 2004.
- ALENCAR, M.M.A.; ROCHA, M.F.G.; PINHEIRO, D.C.S.N. Inflamação e sua modulação por anti-inflamatórios não esteróides: riscos e benefícios. **Ciência Animal**, v. 15, p. 33-41, 2005.
- ALTER, G.; KAVANAGH, D.; RIHN, S.; LUTEIJN, R.; BROOKS, D.; OLDSTONE, M.; VAN LUNZEN, J.; ALTFELD, M. IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 1905-13, 2010.
- ANDRADE, SILVA, T.C.; P.B.; PAIVA-MARTINS, F.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, D.M. *In vitro* anti-inflammatory and cytotoxic effects of aqueous extracts from the edible sea anemones *Anemonia sulcata* and *Actinia equina*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 653, 2017.
- ANTI, S.M.A.; GIORGI, R.D.N.; CHAHADE, W.H. Anti-inflamatórios hormonais: glicocorticóides. **Einstein**, v. 6, p. S159-65, 2008.
- ARAÚJO, M.J.A.M. **Estudo de parâmetros toxicológicos em animais tratados com própolis e geoprópolis de abelhas nativas do Maranhão**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luís, 2009.
- ARAÚJO, M.J.A.M.; BÚFALO, M.C.; CONTI, B.J.; FERNANDES JR. A.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, p. 12-20, 2015.
- ARULSELVAN, P.; FARD, M.T.; TAN, W.S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M.E.; KUMAR, S.S. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-15 2016.
- ASGHARPOUR, F.; MOGHADAMNIA, A.A.; MOTALLEBNEJAD, M.; NOURI, H.R. Propolis attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through intracellular ROS and NO levels along with downregulation of IL-1 $\beta$  and IL-6 expressions in murine RAW 264.7 macrophages. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, p. 12926, 2019.
- ASSUNÇÃO, A.K.M. **Efeito antitumoral do tratamento profilático com extrato hidroalcolico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2009.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 669-92, 2009.
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A.N. Anti-inflammatory activity of natural products. **Molecules**, v. 21, p. 10, 2016.
- BANKOVA, V.B.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 53, p. 402-6, 1998.

- BANKOVA, V.; POPOV, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 88-92, 2007.
- BANKOVA, V.; BERTELLI, D.; BORBA, R.; CONTI, B.J.; CUNHA, I.B.S.; DANERT, C.; EBERLIN, M.N.; FALCÃO, S.I.; ISLA, M.I.; MORENO, M.I.N.; PAPOTTI, G.; POPOVA, M.; SANTIAGO, K.B.; SALAS, A.; SAWAYA, A.C.H.F.; SCHWAB, N.V.; SFORCIN, J.M.; SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M.; TRUSHEVA, B.; VILAS-BOAS, M.; WILSON, M. & ZAMPINI, C. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, p. 1-49, 2019.
- BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 188, p. 413-20, 2008.
- BARTOLOMEU, A.R.; FRIÓN-HERRERA, Y.; SILVA, L.M.; ROMAGNOLI, G.G.; OLIVEIRA, D.E.; SFORCIN, J.M. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 48-55, 2016.
- BHADAURIA, M.; NIRALA, S.K.; SHUKLA, S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2703–12, 2008.
- BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 460–75, 2003.
- BÚFALO, M.C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LIBERAL, J.; CRUZ, M.T.; LOPES, M.C.; BATISTA, M.T.; SFORCIN, J.M. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 84-92, 2013.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-63, 1998.
- CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; AND ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, p. 7204–18, 2017.
- CHEN, F.; HAO, L.; ZHU, S.; YANG, X.; SHI, W.; ZHENG, K.; WANG, T.; CHEN, H. Potential adverse effects of dexamethasone therapy on COVID-19 patients: review and recommendations. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, p. 1907-31, 2021.
- CUNHA, M.G.; ROSALEN, P.L.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S.M. D.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J.A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. **Planta Medica**, v. 82, p. 190-94, 2015.
- CRABTREE, G.R.; S.; GILLIS, S.; SMITH, K.A.; MUNCK, A. Glucocorticoids and immune responses **Arthritis & Rheumatology**, v. 22, p. 1246-56, 1979.
- DAVILA, J.A.; HERNANDEZ DE LOS RIOS, A. An overview of peripheral blood mononuclear cells as a model for immunological research of *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 24, 2019.
- DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B.; SHARMA, K.; SHAH, S.A.; NAQVI, S.A.; DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 77-82, 1991.
- DUALIBE, S.A.C.; GONÇALVES, A.G.; AHID, F.J.M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, p. 420-3, 2007.
- DUTRA, R.P.; NOGUEIRA, A.M.C.; MARQUES, R.R.O.; COSTA, M.C.P.; RIBEIRO, M.N.S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 557-62, 2008.

- DUTRA, R.P.; ABREU, B.V.B.; CUNHA, M.S.; BATISTA, M.C.A.; TORRES, L.M.B.; NASCIMENTO, F.R.F.; RIBEIRO, M.N.S.; GUERRA, R.N.M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2549-57, 2014.
- DUTRA, R. P.; BEZERRA, J. L.; SILVA, M. C. P.; BATISTA, M. C. A.; PATRÍCIO, F.J. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M. Antileishmanial activity and chemical composition from Brazilian geopropolis produced by stingless bee *Melipona fasciculata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 287–93, 2019.
- FAUDZI, S.M.; ABDULLAH, M.A.; ABDULL, M.R.; ISMAIL, A.Z.; RULLAH, K.; ALUWI, M.F.F.; RAMLI, A.N.; ABAS, F.; LAJIS, N.H. Inhibition of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production by pyrrolylated-chalcones: synthesis, biological activity, crystal structure analysis, and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 2019, p. 103376, 2019.
- FERREIRA, B.L.; GONZAGA, L.V.; VITALI, L.; MICKE, G.A.; MALTEZ, H.F.; RESSUREIÇÃO, C.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Southern-Brazilian geopropolis: a potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. **Food Research International**, v.126, p. 108683, 2019.
- FOGEL, I.; AMIR, J.; BAR-ON, E.; HAREL, L. Dexamethasone therapy for septic arthritis in children. **Pediatrics**, v. 136, p. 776-82, 2015.
- FOUGÈRE, B.; BOULANGER, E.; NOURHASHÉMI, F.; GUYONNET, S.; CESARI, M. Chronic inflammation: accelerator of biological aging. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 72, p. 1218–25, 2016.
- FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age associated diseases. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 69, p. 4–9, 2014.
- FRANCHIN, M.; DA CUNHA, M.G.; DENNY, C.; NAPIMOGA, M.H.; CUNHA, T.M.; KOO, H.; DE ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 709–15, 2012.
- FRANCHIN, M.; ROSALEN, P.L.; DA CUNHA, M.G.; SILVA, R.L.; COLÓN, D.F.; BASSI, G.S.; DE ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F.Q.; BEUTLER, J.A.; CUNHA, T.M. Cinnamoyloxy-mammeisin isolated from geopropolis attenuates inflammatory process by inhibiting cytokine production: involvement of MAPK, AP-1, and NF- $\kappa$ B. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 1828-33, 2016.
- FREITAS, M.O.; PONTE, F.A.F.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Flavonoids and Triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 532-5, 2008.
- GOMES, V.A. **Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da própolis de *Melipona compressipes fasciculata* (túba)**. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA, São Luís, 2005.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. The pharmacological basis of therapeutics: a textbook of pharmacology, toxicology and therapeutics for physicians and medical students. **Preface to the fifth edition**, ed. 13, v. 5, p. 5-6. 1975.
- GOVERNA, P.; CUSI, M.G.; BORGONETTI, V.; SFORCIN, J.M.; TERROSI, C.; BAINI, G.; MIRALDI, E.; BIAGI, M. Beyond the biological effect of a chemically characterized poplar propolis: antibacterial and antiviral activity and comparison with flurbiprofen in cytokines release by LPS-stimulated human mononuclear cells. **Biomedicines**, v. 7, p. 73, 2019.
- GHSALBERTI, E.L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, p. 59-84, 1979.

- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Textbook of medical physiology, ed. 11, **Elsevier Saunders**, Philadelphia, 2006.
- HOWREN, M.B.; LAMKIN, D.M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, p. 171–86, 2009.
- HUNGNESS, E.S.; PRITTS, T.A.; LUO, G.J.; SUN, X.; PENNER, C.G.; HASSELGREN, P.O. The transcription factor activator protein-1 is activated and interleukin-6 production is increased in interleukin-1beta-stimulated human enterocytes. **Shock**, v. 14, p. 386-91, 2000.
- KIM, B.Y.; SON, Y.; LEE, J.; CHOI, J.; KIM, C.D.; BAE, S.S. Dexamethasone inhibits activation of monocytes/macrophages in a milieu rich in 27-oxygenated cholesterol. **PLoS One**, v. 12, p. 0189643, 2017.
- KÖNIG, S.; PACE, S.; PEIN, H.; HEINEKAMP, T.; KRAMER, J.; ROMP, E.; STRAßBURGER, M.; TROISI, F.; PROSCHAK, A.; DWORSCHAK, J.; SCHERLACH, K.; ROSSI, A.; SAUTEBIN, L.; HAEGGSTRÖM, J.Z.; HERTWECK, C.; BRAKHAGE, A. A.; GERSTMEIER, J.; PROSCHAK, E.; WERZ, O. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* abrogates leukotriene B4 formation through inhibition of leukotriene a4 hydrolase. **Cell Chemical Biology**, 26, p. 524–34, 2019.
- KUROWSKA, A.; BODYS-CUPAK, I.; STASZKIEWICZ, M.; SZKLARCZYK, J.; ZALEWSKA-PUCHAŁA, J.; KLIŚ-KALINOWSKA, A.; MAKARA-STUDZIŃSKA, M.; MAJDA, A. Interleukin-6 and melatonin as predictors of cognitive, emotional and functional ageing of older people. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 3623, 2020.
- LAVINAS, F.C.; MACEDO, E.H.B.C.; SÁ, G.B.L.; AMARAL, A.C.F.; SILVA, J.R.A.; AZEVEDO, M.M.B.; RODRIGUES, I.A. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: Promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 389–99, 2019.
- LAWRENCE, T.; WHILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-95, 2002.
- LEE, J.K.; KIM, N.J. RECENT Advances in the Inhibition of p38 MAPK as a Potential Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease, **Molecules**, v. 22, p. 1287, 2017.
- LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 725-34, 2002.
- LI, Z.; YU, X.; WERNER, J.; BAZHIN, A.V.; D'HAESE, J.G. The role of interleukin-18 in pancreatitis and pancreatic cancer. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 50 p. 1-12, 2019.
- LIBÉRIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; ARAÚJO, M.J.A.M.; DUTRA, R.P.; NASCIMENTO, F.R.F.; MONTEIRO-NETO, V.; RIBEIRO, M.N.S.; GONÇALVES, A.G.; GUERRA, R.N.M. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 1-9, 2009.
- LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S.C. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, p. 17023, 2017.
- LONGUI, C.A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 163-71, 2007.
- MACEDO, J.M.S.; OLIVEIRA, I.R. Corticoesteróides. **Farmacologia**, v. 4, p. 760-75, 1998.
- MACEDO, R.B.V.; KAKEHASI, A.M.; MELO A.M.V. Ação da IL-33 na artrite reumatoide: contribuição para a fisiopatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, p. 451-57, 2016.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–35, 2008.

- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 72, p. 405-11, 2005.
- MOHAMMADZADEH, S.; SHARRIATPANAHI, M.; HAMED, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N.; OSTAD, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chemical**, v. 103, p. 1097-03, 2007.
- MURAD, J.M.; CALVI, S.A.; SOARES, A.M.V.C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 331-4, 2002.
- MYLES, P.S.; CORCORAN, T. Benefits and risks of dexamethasone in noncardiac surgery. **Anesthesiology**, v.135, p. 895-903, 2021.
- OLIVEIRA, L.P.G.; CONTE, F.L.; CARDOSO, E.O.; CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; GOLIM, M.A.; CRUZ, M.T.; SFORCIN, J.M. Immunomodulatory/inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 1551-8, 2016.
- OLIVEIRA, L.P.G.; CONTE, F.L.; OLIVEIRA CARDOSO, E.; CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; DE ASSIS G.; SFORCIN, J.M. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. **Life Sciences**, v. 217, p. 81–90, 2019.
- OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, 2011.
- ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, p. 205-19, 2000.
- ORSOLIC, N.; BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 561–70, 2005.
- PAIVA-OLIVEIRA, E.L.; SILVA, A.C.; SILVA, R.M.; SEVENINI, L.A.; MELO, H.A.; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRICO-SANTOS, P. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, p. 96-102, 2012.
- PETTET, G.; BYRNE, H. M.; MCELWAIN, D. L.; NORBURY J. A model of wound-healing angiogenesis in soft tissue. **Mathematics Biosciences**, v.136, p. 35-63. 1996.
- REDONDO, A.C.C.; CECCON, E. J. R.; SILVEIRA-LESSA, A. L.; QUINELLO, C.; PALMEIRA, P.; CARVALHO, W. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Expressão do TLR-2 e do TLR-4 em monócitos de recém-nascidos a termo com sepse tardia. **Jornal de Pediatria**, v. 90, p. 472-8, 2014.
- SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 33-8, 2005.
- SANTOS, C.M.; CAMPOS, J.F.; DOS SANTOS, H.F.; BALESTIERI, J.B.P.; SILVA, D. B.; SOUZA, K.P.; CAROLLO, C.A.; ESTEVINHO, L.M. Chemical composition and pharmacological effects of Geopropolis produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017.
- SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O'GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, p. 20190418, 2020.
- SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878–88, 2011.

- SCHREIBER, S.; NIKOLAUS, S.; HAMPE, J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, p. 477-84, 1998.
- SERHAN, C.N.; LEVY, B.D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **Journal of Clinical Investigation**, v.128, p. 2657, 2018.
- SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.
- SILVA, B.B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGIMOTO, E. S.; CASARIN, R. C. V.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L.; MAYER, M. P. A. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 100-7, 2017.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte: **Composição e Arte**, v. 2002, p. 253, 2002.
- SIMMONS, D.L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 210-9, 2006.
- SOUZA JUNIOR, U. P.; CABRERA, S. P.; SILVA, T. M. G.; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Geopropolis gel for the adjuvant treatment of candidiasis – formulation and *in vitro* release assay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.29, p. 278-86, 2019.
- SOUZA, S.A.; DA SILVA, T.M.G.; DA SILVA, E.M.S.; CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S. Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**, v. 29, p. 549–58, 2017.
- STEVENS, S.R.; CHANG, T.H. History of development of TNF inhibitors. **TNF-alpha Inhibitors**, v. 2006, p. 9-22, 2006.
- TURNER, M.D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D.J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, p. 2563–82, 2014.
- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature: New Biology**, v. 231, p. 232-35, 1971.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.
- WANG, X.; FENG, Y.; FU, J.; WU, C.; HE, B.; ZHANG, H.; WANG, X.; DAI, W.; SUN, Y.; ZHANG, Q. A lipid micellar system loaded with dexamethasone palmitate alleviates rheumatoid arthritis. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, p. 316, 2019.
- WOLF, G.; LIVSHITS, D.; BEILIN, B.; YIRMIYA, R.; SHAVIT, Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain, Behavior and Immunology**, v. 22, p. 1072-7, 2008.
- YOON, S.B.; LEE, Y.J.; PARK, S.K.; KIM, H.C.; BAE, H.; KIM, H.M.; KO, S.G.; CHOI, Y.; OH, M.S.; PARK, W. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 286-90, 2009.
- YU, Z.Q.; WANG, L.M.; YANG, W.X. How vitamin E and its derivatives regulate tumour cells via the MAPK signalling pathway? **Gene**, v. 808, p. 145998, 2022.
- ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27-37, 2007.

**ANEXO 1**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO**  
**466/2012 – Doadores Saudáveis**

CONVIDO, o(a) Senhor(a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “POSSÍVEL AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E IMUNOMODULADORA DA GEOPRÓPOLIS ASSOCIADA À DEXAMETASONA SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO”, que será desenvolvido por mim, Mariana da Silva Honorio, sob orientação do Professor José Maurício Sforcin, do Instituto de Biociências (UNESP - Botucatu).

Sua participação nesta pesquisa se dará por ser uma pessoa saudável, sem nenhum tipo de doença. Estou estudando os efeitos da geoprópolis associada a um produto anti-inflamatório (dexametasona) sobre determinadas células do sistema imunológico (células mononucleares do sangue periférico).

Para que eu possa obter estas células, preciso coletar 20 mL do seu sangue. O(a) senhor(a) não será tratado com a geoprópolis ou com o produto anti-inflamatório, apenas as suas células que forem retiradas.

Para se incluir no estudo, os doadores deverão ser maiores de 18 anos, saudáveis, não fumantes, que não possuam vínculo com a UNESP, que não tenham ingerido bebidas alcoólicas na noite anterior, que não estejam tomando anti-inflamatórios ou outros medicamentos imunomoduladores.

Para a exclusão de doadores, ser menores de 18 anos, não saudáveis, fumantes, que possuam vínculo com a UNESP, que tenham ingerido bebidas alcoólicas na noite anterior, que estejam tomando anti-inflamatórios ou outros medicamentos imunomoduladores.

Os riscos para o(a) senhor(a) implicam em uma picada de agulha para retirada do sangue o que pode ser dolorido, e o lugar da picada pode ficar roxo e sensível. O(A) senhor(a) não terá nenhum benefício direto porém, a doação do sangue permitirá a realização de uma pesquisa que no futuro pode melhorar a qualidade de vida de pessoas com doenças inflamatórias crônicas e que passam pelo tratamento contínuo com anti-inflamatórios.

O material biológico que coletaremos do(a) senhor(a) será utilizado em sua totalidade, não restando material para ser utilizado em outro projeto de pesquisa.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que, mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8.00 às 11.30 e das 14.00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem que minha identidade seja revelada.

Botucatu, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Pesquisador: Mariana da Silva Honorio

\_\_\_\_\_  
 Participante da Pesquisa

Depto. de Ciências Químicas e Biológicas

IB - UNESP - Campus Botucatu

(14) 3880 0425

[maashonorio@gmail.com](mailto:maashonorio@gmail.com)

Orientador: Prof. Adj. José Maurício Sforcin

(14) 3880 0445

[jose.m.sforcin@unesp.br](mailto:jose.m.sforcin@unesp.br)