



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**MARIANA DA SILVA HONORIO**

**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM MACRÓFAGOS  
DERIVADOS DE CÉLULAS THP-1 TRATADOS COM  
GEOPRÓPOLIS EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS E ANÁLISE  
PROTEÔMICA EM MONÓCITOS HUMANOS**

**BOTUCATU-SP**

**2026**

**MARIANA DA SILVA HONORIO**

**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM MACRÓFAGOS  
DERIVADOS DE CÉLULAS THP-1 TRATADOS COM  
GEOPRÓPOLIS EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS E ANÁLISE  
PROTEÔMICA EM MONÓCITOS HUMANOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, Unesp, Campus de Botucatu, para obtenção do título de doutora.

**Orientador:** Prof. Titular José Maurício Sforcin

**BOTUCATU-SP**

**2026**

H774p

Honorio, Mariana da Silva

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE CÉLULAS THP-1 TRATADOS COM GEOPRÓPOLIS EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS E ANÁLISE PROTEÔMICA EM MONÓCITOS HUMANOS / Mariana da Silva Honório. -- , 2026

80 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu,

Orientador: José Maurício Sforcin

1. inflamação. 2. macrófago. 3. imunomodulação. 4. geoprópolis. 5. análise proteômica. I. Título.

### **Impacto potencial da pesquisa**

Este estudo contribui para o entendimento dos efeitos imunomoduladores da geoprópolis em modelos celulares da imunidade inata, a partir de análises funcionais e proteômicas, ampliando o conhecimento sobre a ação biológica e sugerindo um potencial uso isolado ou como adjuvante terapêutico.

### **Potential impact of this research**

This study contributes to the understanding of the immunomodulatory effects of geopropolis in cellular models of innate immunity, based on functional and proteomic analyses, expanding the knowledge about its biological action and suggesting its potential use alone or included as a therapeutic adjuvant.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANA DA SILVA HONORIO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 26 de fevereiro de 2026, às 14h, no(a) Anfiteatro 1, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de MARIANA DA SILVA HONORIO, intitulada "**Parâmetros imunológicos em macrófagos derivados de células THP-1 tratados com geoprópolis em condições inflamatórias e análise proteômica em monócitos humanos**". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB, Prof. Dr. JESÚS EFRAIN ALDAY NORIEGA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Químico-Biológicas / Universidade de Sonora - México, Profa. Dra. MÁRCIA ANTONIAZI MICHELIN (Participação Virtual) do(a) Microbiologia, Imunologia e Parasitologia / Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Pesquisadora Titular GISLENE ALMEIDA CARVALHO-ZILSE (Participação Virtual) do(a) Coordenação de Biodiversidade (COBIO) / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Profa. MARIA CRISTINA DA SILVA PRANCHEVICIUS (Participação Virtual) do(a) UFScar, Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente  
 JOSE MAURICIO SFORCIN  
Data: 27/02/2026 08:54:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Maria da Silva Honório e Ailton José Honório, e minha irmã, Patrícia da Silva Antunes, por sempre incentivarem e apoiarem meus estudos, minhas escolhas e meus sonhos, mesmo quando o caminho foi longo e desafiador. O apoio de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao meu namorado, Guilherme Domingues, pelo amor, apoio, paciência e incentivo ao longo de toda essa trajetória. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos de cansaço, ansiedade e incertezas, e por acreditar em mim mesmo quando eu duvidei. Seu apoio foi essencial para que eu conseguisse seguir em frente e concluir este trabalho.

Aos meus tios, Adenilda Cristina Honório França e Eduardo Luzia França, e minhas primas, Danielle Cristina Honório França e Emanuelle Carolina Honório França, por despertarem em mim, desde a graduação, o interesse pela ciência e pela pesquisa, e por serem inspiração constante na minha trajetória acadêmica e na vida.

Ao meu orientador, José Maurício Sforcin, pela orientação ao longo do doutorado, pela confiança no desenvolvimento deste trabalho e pela liberdade intelectual concedida durante o processo. Agradeço pelas discussões científicas, pelas contribuições críticas e pela oportunidade de aprofundar minha formação acadêmica e científica, o que foi fundamental para o meu amadurecimento profissional e pessoal ao longo desta etapa.

Aos membros do laboratório, Emilly, Jonatas, Pedro, Yuri e Arthur, pelo apoio ao longo do trabalho experimental, pelas trocas científicas e pela convivência diária, que tornaram a rotina de laboratório mais colaborativa, leve e enriquecedora.

Ao Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, pela infraestrutura disponibilizada e pelo suporte oferecido por docentes, técnicos e alunos que fizeram parte do cotidiano acadêmico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, pelo apoio institucional, pela formação acadêmica e pelas oportunidades oferecidas ao longo do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado, que possibilitou a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste doutorado e para a minha formação científica e pessoal.

“Sou da opinião de que a curiosidade é uma das maiores virtudes da mente humana.”  
(Ada Lovelace)

## RESUMO

A resposta inflamatória pode ser desencadeada por diversos estímulos, como patógenos, alérgenos, compostos tóxicos ou lesões teciduais, podendo ser aguda ou crônica. Diferentes intervenções terapêuticas têm sido avaliadas para o tratamento da inflamação. A geoprópolis (GEO), produzida por abelhas sem ferrão, apresenta propriedades biológicas promissoras, embora seja menos estudada em comparação à própolis produzida por abelhas africanizadas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos anti-inflamatórios da GEO, isoladamente ou em combinação com concentrações reduzidas de dexametasona (DEXA), em macrófagos derivados da linhagem THP-1 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os marcadores de superfície (TLR2, TLR4, CD80 e CD62L) foram analisados por citometria de fluxo, a produção de citocinas (fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, IL-33 e IL-10) e de eicosanoides (prostaglandina E2 e leucotrieno B4) foi quantificada por ELISA. A atividade bactericida foi avaliada após o tratamento dos macrófagos, desafio com *Staphylococcus aureus* e contagem de unidades formadoras de colônia. A produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi analisada por ensaio colorimétrico. Foi realizada também a análise proteômica após tratamento de monócitos humanos com a GEO. Isoladamente ou em combinação com DEXA, a GEO reduziu significativamente a expressão de marcadores de superfície (TLR2 e CD62L), e a produção de citocinas pró-inflamatórias e eicosanoides, sem afetar a viabilidade celular. Os efeitos dos tratamentos sobre a atividade bactericida e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram inconclusivos. A análise proteômica revelou a modulação de proteínas envolvidas na ativação, amplificação e resolução da inflamação, bem como no controle do estresse oxidativo, reforçando o perfil imunomodulador da GEO. Em conjunto, esses achados contribuem para a compreensão dos efeitos da GEO sobre células do sistema imune inato e apontam seu potencial uso isolado ou como adjuvante terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias.

**Palavras-chave:** inflamação; macrófago; imunomodulação; geoprópolis; análise proteômica.

# IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN MACROPHAGES DERIVED FROM THP-1 CELLS TREATED WITH GEOPRÓPOLIS UNDER INFLAMMATORY CONDITIONS AND PROTEOMIC ANALYSIS IN HUMAN MONOCYTES

## ABSTRACT

The inflammatory response can be triggered by several stimuli, such as pathogens, allergens, toxic compounds, or tissue injury, and may be acute or chronic. Different therapeutic interventions have been evaluated for the treatment of inflammation. Geopropolis (GEO), produced by stingless bees, presents promising biological properties, although it is less studied compared to propolis produced by Africanized bees. The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of GEO, alone or in combination with reduced concentrations of dexamethasone (DEXA), in macrophages derived from the THP-1 cell line stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Cell viability was assessed by the MTT assay. Surface markers (TLR2, TLR4, CD80, and CD62L) were analyzed by flow cytometry, and the production of cytokines (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, IL-33, and IL-10) and eicosanoids (prostaglandin E2 and leukotriene B4) was quantified by ELISA. Bactericidal activity was evaluated after macrophage treatment, challenge with *Staphylococcus aureus*, and colony-forming unit counting. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production was analyzed by a colorimetric assay. Proteomic analysis was also performed after treating human monocytes with GEO. Alone or in combination with DEXA, GEO significantly reduced the expression of surface markers (TLR2 and CD62L) and the production of proinflammatory cytokines and eicosanoids, without affecting cell viability. The effects of the treatments on bactericidal activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production were inconclusive. Proteomic analysis revealed the modulation of proteins involved in the activation, amplification, and resolution of inflammation, as well as in the control of oxidative stress, reinforcing the immunomodulatory profile of GEO. Taken together, these findings contribute to the understanding of the effects of GEO on innate immune system cells and indicate its potential use alone or as an adjuvant therapy in the treatment of inflammatory diseases.

**Keywords:** inflammation; macrophage; immunomodulation; geopropolis; proteomic analysis.

## SUMÁRIO

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                       | 10 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                                        | 17 |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                                   | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                                            | 18 |
| 3. METODOLOGIA.....                                                                       | 18 |
| 3.1 Obtenção das amostras de geoprópolis.....                                             | 18 |
| 3.2 Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e da solução de dexametasona..... | 19 |
| 3.3 Cultura de células THP-1.....                                                         | 19 |
| 3.4 Diferenciação das células THP-1 monocíticas em macrófagos .....                       | 20 |
| 3.5 Viabilidade celular.....                                                              | 20 |
| 3.6 Avaliação de marcadores de superfície celular .....                                   | 21 |
| 3.7 Determinação da produção de citocinas .....                                           | 21 |
| 3.8 Determinação da produção de metabólitos do ácido araquidônico.....                    | 22 |
| 3.9 Atividade bactericida contra <i>S. aureus</i> .....                                   | 22 |
| 3.10 Produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) .....                                | 23 |
| 3.11 Análise proteômica .....                                                             | 24 |
| 3.11.1 Obtenção dos monócitos humanos .....                                               | 24 |
| 3.11.2 Extração de proteínas.....                                                         | 25 |
| 3.11.3 Quantificação de proteínas .....                                                   | 25 |
| 3.11.4 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....              | 25 |
| 3.11.5 Digestão de proteínas em solução .....                                             | 25 |
| 3.11.6 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas .....                        | 26 |
| 3.11.7 Análise dos dados.....                                                             | 27 |
| 3.12 Análise estatística.....                                                             | 28 |
| 4. RESULTADOS .....                                                                       | 28 |
| 4.1 Diferenciação das células THP-1 monocíticas em macrófagos .....                       | 28 |
| 4.2 Viabilidade Celular.....                                                              | 29 |
| 4.3 Avaliação de marcadores de superfície celular .....                                   | 30 |
| 4.4 Determinação da produção de citocinas .....                                           | 31 |
| 4.5 Determinação da produção de metabólitos do ácido araquidônico.....                    | 36 |
| 4.6 Atividade bactericida e geração de $H_2O_2$ .....                                     | 37 |
| 4.7 Análise proteômica de monócitos humanos tratados com geoprópolis.....                 | 38 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                                        | 56 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                                                         | 71 |
| 7. REFERÊNCIAS .....                                                                      | 72 |

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta molecular e celular que pode ser desencadeada por estímulos como agentes patogênicos, compostos tóxicos ou lesão tecidual. Além de sua função fisiológica na defesa contra infecções, está envolvida no desenvolvimento e progressão de diversas doenças alérgicas, autoimunes e inflamatórias crônicas, atuando como um processo biológico essencial para a manutenção e restauração da homeostase (MEDZHITOV, 2008; OKIN & MEDZHITOV, 2012; ARULSELVAN *et al.*, 2016; AZAB *et al.*, 2016; PANIGRAHY *et al.*, 2021). O equilíbrio entre seus efeitos benéficos e lesivos depende do controle preciso da ativação inflamatória, uma vez que, quando desregulada, a inflamação pode contribuir para patologias como asma, doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos (FURMAN *et al.*, 2019; PAHWA *et al.*, 2023).

O início da resposta inflamatória depende fundamentalmente do reconhecimento inicial do estímulo agressor pelo sistema imune inato. Esse reconhecimento constitui o evento fundador da inflamação, uma vez que permite que a célula distinga sinais de perigo, sejam eles provenientes de patógenos ou de dano tecidual, e converta essa informação em respostas moleculares e celulares organizadas. Esse processo é mediado principalmente por receptores de reconhecimento padrão (PRR), entre os quais se destacam os receptores semelhantes a Toll (*Toll-like receptors*, TLR), capazes de identificar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; MEDZHITOV, 2008; AKIRA *et al.*, 2006; KAWAI & AKIRA, 2010; MATZINGER, 2002).

Expressos na membrana plasmática ou em compartimentos endossomais de diversas células do sistema imune, incluindo monócitos e macrófagos, esses receptores atuam como sensores iniciais da inflamação. A ligação de um estímulo inflamatório a esses receptores desencadeia uma cascata de sinalização intracelular altamente regulada, envolvendo proteínas adaptadoras como MyD88, TRIF e TRAF6. Essa sinalização converte o estímulo extracelular em respostas intracelulares coordenadas, culminando na ativação de vias de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como JNK e ERK, e de fatores de transcrição centrais à inflamação, como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e a proteína ativadora (AP)-1 (lee *et al.*, 2014).

Os TLRs também promovem a expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), fundamentais para a ativação de linfócitos T e a resposta imunitária adaptativa. A MAPK p38, sensível a estímulos como citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROS),

desempenha papel importante na inflamação crônica e é considerada um alvo terapêutico promissor em doenças como artrite reumatoide, asma e patologias neurodegenerativas (LEE & KIM, 2017).

Como consequência direta dessa ativação molecular inicial, a inflamação aguda manifesta-se no tecido por meio da produção e liberação coordenada de mediadores inflamatórios, com destaque inicial para as citocinas, seguidas por aminas vasoativas e mediadores lipídicos, como os eicosanoides (ARULSELVAN *et al.*, 2016; SUGIMOTO *et al.*, 2016).

As citocinas exercem papel central na orquestração da resposta inflamatória, atuando tanto na ativação celular quanto na regulação da intensidade e duração do processo. Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), promovem ativação endotelial, recrutamento de leucócitos e indução de outros mediadores inflamatórios, enquanto citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4, fator transformador do crescimento (TGF)- $\beta$  e IL-13, contribuem para o controle da resposta e para a transição em direção à resolução inflamatória (COUTINHO & CHAPMAN, 2011; TURNER *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2017).

Em resposta à ação dessas citocinas e à ativação celular, ocorre também a liberação de mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico, conhecidos como eicosanoides. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídios de membrana pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub> durante a ativação inflamatória e convertido, pelas vias da ciclooxigenase (COX) e da lipoxigenase (LOX), em prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Esses mediadores participam diretamente da vasodilatação, do aumento da permeabilidade vascular, da dor e do recrutamento celular, contribuindo para a amplificação da resposta inflamatória local (YAMAGUCHI *et al.*, 2022).

Do ponto de vista intracelular, essa ativação inflamatória também se reflete em alterações profundas no perfil proteico das células envolvidas na resposta imune. Abordagens proteômicas têm demonstrado a superexpressão de enzimas inflamatórias, proteínas de adesão e biomarcadores associados à ativação celular, como S100A8 e S100A9, os quais estão diretamente relacionados à amplificação da resposta inflamatória e ao recrutamento de leucócitos (MEDZHITOV, 2008; SIGDEL *et al.*, 2024).

Além disso, durante a inflamação, pode ocorrer a formação do inflamassoma, um complexo multiproteico intracelular responsável pelo reconhecimento de sinais de perigo, como produtos microbianos e alterações iônicas. A ativação do inflamassoma leva à ativação de caspases inflamatórias, especialmente a caspase-1, regulando a maturação de citocinas

como IL-1 $\beta$  e IL-18, bem como formas específicas de morte celular inflamatória, como a piroptose. Esse mecanismo tem sido associado a diversas condições patológicas, incluindo choque séptico, gota, epilepsia e dor neuropática, sendo considerado um alvo terapêutico relevante no contexto inflamatório (PAIVA-OLIVEIRA *et al.*, 2012; SHARMA & KANNEGANTI, 2021).

Localmente, a inflamação manifesta-se por sinais inflamatórios cardinais, como edema, hipertermia (calor), hiperemia (vermelhidão), dor e perda de função, com posterior reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008; FRANCESCHI & CAMPISI, 2014; FOUGÈRE *et al.*, 2016).

A inflamação pode tornar-se crônica quando o estímulo inflamatório persiste, levando à sensibilização de nociceptores, dor e perda funcional (FRANCESCHI & CAMPISI, 2014). Fatores como infecções persistentes, corpos estranhos ou exposição química contínua favorecem sua cronificação e a manutenção da produção de mediadores inflamatórios (ARULSELVAN *et al.*, 2016).

Há vários mecanismos que operam para encerrar o processo inflamatório e iniciar a remodelação do tecido, coletivamente denominados de resolução inflamatória. Esse processo é ativo e altamente regulado, envolvendo a produção de mediadores especializados pró-resolução (SPMs, *specialized pro-resolving mediators*), que atuam para restaurar a homeostase tecidual. Entre esses mediadores, destacam-se os eicosanoides anti-inflamatórios, como as lipoxinas (Lxs), derivadas do ácido araquidônico (ômega-6), e as resolvinas (RVs), maresinas (MaRs), e protectinas (Pds), derivadas de ácidos graxos ômega-3 (DHA e EPA) (BASIL & LEVY, 2016). As LXs promovem a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, inibem a migração adicional de leucócitos para o tecido e reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1 $\beta$ . Já as MaRs e RVs desempenham papéis cruciais na reparação tecidual, estimulando a regeneração celular e a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (BASIL & LEVY, 2016). Além disso, a resolução da inflamação envolve a mudança no perfil de macrófagos, de um fenótipo pró-inflamatório (M1) para um fenótipo anti-inflamatório e pró-resolução (M2), secretando citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ , essenciais para a cicatrização e remodelação do tecido (LOCATI *et al.*, 2013). Glicocorticoides endógenos como o cortisol também contribuem para a regulação negativa dessa resposta.

Os macrófagos são células centrais no processo inflamatório, desempenhando papéis essenciais tanto na ativação quanto na resolução da inflamação. Como células residentes, mantêm a homeostase tecidual por meio da fagocitose de detritos celulares, secreção de

mediadores e remodelação da matriz extracelular (MOSSER *et al.*, 2008). São células de alerta que, ao reconhecerem PAMPs ou DAMPs por meio de PRR, liberam citocinas, quimiocinas e outras moléculas que induzem a inflamação (ROH *et al.*, 2018), promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de neutrófilos e monócitos para o tecido inflamado e sensibilização de nociceptores (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017). Já os monócitos circulantes migram para os tecidos em resposta a sinais liberados por células sentinelas, como os macrófagos residentes, diferenciando-se em subtipos funcionais, como macrófagos M1 e M2 (LOCATI *et al.*, 2013). Os macrófagos M1 são ativados por estímulos como lipopolissacarídeo (LPS) e interferon (IFN)- $\gamma$ , produzindo citocinas pró-inflamatórias (ex.: TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6) e EROS, como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que ajudam a eliminar patógenos. Por outro lado, os macrófagos M2 promovem a reparação tecidual e a resolução da inflamação através da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Para estudar esses processos, a linhagem celular humana THP-1, derivada de leucemia monocítica, é amplamente empregada em modelo *in vitro*. Após tratamento com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), essas células tornam-se aderentes e funcionalmente semelhantes a macrófagos, sendo úteis para investigar mecanismos inflamatórios e respostas imunológicas (CHANPUT *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2023).

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desempenha um papel crucial no processo inflamatório, especialmente na atividade fagocítica dos macrófagos. Durante a inflamação, os macrófagos ativados geram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como parte da "explosão respiratória", um mecanismo de defesa mediado pela enzima NADPH oxidase. Essa enzima converte oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) em ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que é subsequentemente transformado em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela ação da superóxido dismutase (SOD) (BEDARD & KRAUSE, 2007). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como um agente microbicida, danificando membranas celulares e componentes intracelulares de patógenos, além de modular vias de sinalização inflamatória, como a ativação de NF- $\kappa$ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias (WINTERBOURN, 2013).

Diversas abordagens têm sido exploradas para elucidar os mecanismos envolvidos nas doenças inflamatórias, incluindo a análise proteômica. O proteoma corresponde ao conjunto de proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em determinado momento, sob condições específicas. A análise proteômica possibilita a identificação de variações proteicas decorrentes de eventos pós-transcricionais e pós- tradução, como *splicing* alternativo, fosforilação, glicosilação, ubiquitinação e acetilação, além da formação

de complexos e interações moleculares (TYANOVA & COX, 2018; SIGDEL *et al.*, 2024). Essa técnica é particularmente útil no contexto inflamatório, permitindo detectar alterações no perfil proteico em diferentes fases da inflamação, identificar biomarcadores e elucidar vias de sinalização relevantes. Sua aplicação tem se mostrado essencial para a pesquisa translacional e o desenvolvimento de terapias personalizadas (WANG *et al.*, 2024).

As principais intervenções terapêuticas contra doenças inflamatórias incluem o uso de inibidores da COX. Em 1971, VANE *et al.* descreveram o mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que atuam inibindo a produção de prostaglandinas por meio da inibição das isoformas COX-1 e COX-2 (VANE, BAKHLE & BOTTING, 1998). Outra forma de tratamento amplamente utilizado, são as terapias com o uso de 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 normais. Os glicocorticoides geralmente atuam no metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e são secretados em maiores quantidades em situações traumáticas e estressantes. No entanto, quando administrados em doses farmacológicas elevadas ou por períodos prolongados, os glicocorticoides podem induzir efeitos colaterais significativos, como distúrbios metabólicos, como hiperglicemia, resistência à insulina e obesidade, além de osteoporose, supressão da função adrenal e aumento da suscetibilidade a infecções (LONGUI, 2007; RAMAMMORTHY & CIDLOWSKI, 2016; REICHARDT *et al.*, 2021).

Dentre os glicocorticoides, a dexametasona (DEXA) é amplamente utilizada na prática clínica, indicada para o tratamento de condições alérgicas, inflamatórias e sintomas associados a diversas doenças, incluindo distúrbios reumáticos, dermatológicos, oculares, glandulares, pulmonares, hematológicos e gastrointestinais, tanto em adultos quanto em crianças. Trata-se de um glicocorticoide que mimetiza a ação do cortisol, tornando essa ação mais prolongada, sendo capaz de suprimir o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) por 36 a 72 horas (RHEN & CIDLOWSKI, 2005). A DEXA é mais potente que o cortisol e apresenta ausência de atividade mineralocorticoide, característica que contribui para um menor perfil de efeitos colaterais (GUYTON & HALL, 2006). Um exemplo de sua aplicação avançada foi descrito por LORSCHERIDER *et al.* (2019), que desenvolveram micelas mistas em nanoescala para encapsular o palmitato de DEXA, demonstrando eficácia no alívio da inflamação em modelos de artrite reumatoide.

O mecanismo de ação da DEXA envolve a estabilização de membranas lisossômicas

em leucócitos, reduzindo a liberação de enzimas inflamatórias e a resposta vascular a estímulos lesivos. Além disso, diminui a expressão endotelial de moléculas de adesão, dificultando a migração de leucócitos, inibe a angiogênese e bloqueia a liberação do ácido araquidônico ao inibir a fosfolipase A2, reduzindo, assim, a produção de prostaglandinas e leucotrienos (PETTET *et al.*, 1996; MACEDO & OLIVEIRA, 1998).

O uso prolongado de DEXA, assim como outros glicocorticoides, pode acarretar efeitos colaterais significativos, como aumento de peso, hipertensão, osteoporose, hiperglicemia, fraqueza muscular, úlcera gástrica e maior susceptibilidade a infecções. Esses efeitos decorrem de sua ação sistêmica sobre múltiplos tecidos, incluindo o metabolismo da glicose, no qual atua como hormônio diabetogênico, promovendo gliconeogênese hepática e reduzindo a captação de glicose nos tecidos periféricos (BAUERLE & HARRIS, 2016). Além disso, induz resistência à insulina, agravando o controle glicêmico e elevando o risco de diabetes melitus tipo 2 (RHEN & CIDLOWSKI, 2005). Tais efeitos metabólicos, somados à supressão da função adrenal e alterações cardiovasculares, reforçam a necessidade de estratégias terapêuticas que reduzam os riscos associados ao uso contínuo de glicocorticoides (LONGUI, 2007; HODGENS & SHARMAN, 2023).

Diante do exposto, a busca por novas intervenções terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias tem sido crescente, especialmente incluindo produtos naturais ou sua combinação com fármacos, visando reduzir os efeitos colaterais por meio do uso de menores concentrações. Entre esses produtos destacam-se os de origem apícola e meliponícola, como a própolis e a geoprópolis (GEO). O uso desses produtos remonta à antiguidade, os quais, nas últimas décadas, têm sido amplamente estudados, sobretudo a própolis produzida por abelhas do gênero *Apis*.

As abelhas sociais da família Apidae dividem-se nas subfamílias Apinae, com a espécie *Apis mellifera* L., e Meliponinae, conhecidas como abelhas sem ferrão (SILVEIRA *et al.*, 2002). Os meliponíneos, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, incluem mais de 400 espécies nativas no Brasil, sendo criadas comercialmente devido à facilidade de manejo e segurança (LAVINAS *et al.*, 2019; SOUZA JUNIOR *et al.*, 2019).

As abelhas coletam resinas vegetais e as misturam com secreções mandibulares para produzir própolis, cuja composição varia conforme a flora local e a subespécie de abelha (BANKOVA *et al.*, 2019). A GEO, por sua vez, é elaborada com adição de barro ou terra, como ocorre com a *Melipona fasciculata* Smith, popularmente conhecida como “tiúba do Maranhão” (SOUZA JUNIOR *et al.*, 2019; SILVEIRA *et al.*, 2002). Ambas são utilizadas

na colmeia como parte da estrutura interna, regulação térmica, barreira antimicrobiana e antisséptica (GHISALBERTI, 1979; SALATINO *et al.*, 2005).

A própolis de *A. mellifera* tem sido associada a propriedades imunomoduladora (ORSI *et al.*, 2000; SFORCIN, 2007), antitumoral (ORSOLIC & BASIC, 2005), antimicrobiana (MOHAMMADZADEH *et al.*, 2007), antifúngica (MURAD *et al.*, 2002), antioxidante (AHN *et al.*, 2004), hepatoprotetora (BHADAURIA *et al.*, 2008), cicatrizante e anti-inflamatória, atribuídas a compostos como ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos (MENEZES, 2005). Sua composição é influenciada por fatores geográficos e florísticos (BANKOVA *et al.*, 2000).

Estudos mostram que o extrato de própolis inibe a proliferação de macrófagos RAW 264.7, reduz EROs, óxido nítrico (NO), COX-2, IL-1 $\beta$  e IL-6, demonstrando potencial anti-inflamatório (ASGHARPOUR *et al.*, 2019). A própolis vermelha brasileira também inibiu citocinas inflamatórias e genes relacionados à migração celular, sendo tão eficaz quanto a DEXA, embora por mecanismos distintos (SILVA *et al.*, 2017).

A GEO é um produto elaborado por abelhas sem ferrão pertencentes à tribo *Meliponini*, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. Diferentemente da própolis produzida por *Apis mellifera*, a GEO é formada a partir da mistura de resinas vegetais coletadas pelas abelhas com secreções salivares, cera e partículas de solo ou barro, o que confere características físico-químicas distintas a esse produto. Essa composição complexa reflete diretamente a diversidade botânica da região onde as abelhas coletam os materiais e pode influenciar significativamente suas propriedades biológicas (SALATINO *et al.*, 2005; BANKOVA *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, produtos derivados de abelhas têm sido utilizados na medicina popular para o tratamento de diferentes condições patológicas, incluindo infecções, processos inflamatórios e doenças de pele. No caso específico da GEO, seu uso empírico, por comunidades indígenas e populações regionais, tem sido descrito no tratamento de infecções, dermatoses e distúrbios imunológicos, o que despertou interesse científico na investigação de suas propriedades farmacológicas (FREITAS *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2019). Estudos têm demonstrado que esse produto apresenta uma composição química complexa, que pode incluir ácidos graxos, compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos e saponinas, moléculas frequentemente associadas a atividades biológicas relevantes (DUTRA *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a GEO apresenta atividades biológicas importantes, como propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias,

antitumorais, imunomoduladoras e gastroprotetoras (SANTOS *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Essas propriedades são atribuídas principalmente à presença de compostos bioativos derivados de plantas, cuja composição pode variar conforme a espécie de abelha, a origem geográfica e a vegetação predominante na região (BANKOVA *et al.*, 2000; SALATINO *et al.*, 2005).

Pesquisadores do Maranhão vêm estudando a amostra específica de GEO produzida por *Melipona fasciculata* Smith, demonstrando diferentes atividades biológicas. GOMES (2005) relatou suas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva; DUAILIBE *et al.* (2007) demonstraram sua ação antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*; ASSUNÇÃO (2008) descreveu seu potencial antitumoral; e ARAÚJO (2009) evidenciou baixa toxicidade após administração por via oral. Esses achados reforçam o potencial terapêutico dessa amostra de GEO.

Posteriormente, em 2010, essa amostra foi trazida ao nosso laboratório para investigação mais detalhada. Análises químicas conduzidas por nosso grupo identificaram a presença de compostos como lupeol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirinas e ácido anacárdico, moléculas conhecidas por apresentarem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e imunomoduladoras (ARAÚJO *et al.*, 2015). Esses compostos têm sido associados à modulação de vias inflamatórias e ao controle de processos oxidativos, sugerindo que a GEO possa atuar em diferentes níveis da resposta inflamatória.

Diante do exposto, o presente trabalho foi delineado visando avaliar o possível sinergismo entre a GEO e o fármaco anti-inflamatório DEXA, em condições inflamatórias. A hipótese deste estudo foi que a interação entre a GEO e menores concentrações de DEXA não seria tóxica para a linhagem de células imortalizadas que mimetizam o monócito humano (THP-1) diferenciadas em macrófagos, e exerceria ação anti-inflamatória mais eficiente do que a DEXA isoladamente, podendo culminar em achados que possam favorecer o tratamento de doenças inflamatórias.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório da geoprópolis, isoladamente ou em combinação com baixas concentrações de dexametasona, em macrófagos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 estimulados com LPS.

## 2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito citotóxico da GEO, isolada ou em combinação com DEXA, sobre células THP-1 diferenciadas em macrófagos;
- Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e associadas ao inflamassoma (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18, IL-33 e IL-10) em macrófagos tratados com GEO, isolada ou associada à DEXA, por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Quantificar a produção de metabólitos do ácido araquidônico (PGE2 e LTB4) em macrófagos tratados com GEO e/ou DEXA;
- Analisar a expressão de marcadores de superfície celular (TLR2, TLR4, CD80 e CD62L) por citometria de fluxo;
- Investigar a atividade bactericida dos macrófagos tratados com GEO, isolada ou em combinação com DEXA, e desafiados com *Staphylococcus aureus*;
- Determinar a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por macrófagos tratados com GEO e/ou DEXA por ensaio colorimétrico;
- Realizar análise proteômica abrangente de monócitos humanos com GEO, a fim de identificar alterações em proteínas envolvidas na resposta inflamatória.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1 Obtenção das amostras de geoprópolis

A amostra de GEO utilizada neste estudo foi obtida de colmeias de *Melipona fasciculata* Smith, localizadas no município de Palmeirândia (2° 39' S, 44° 55' O), pertencente à microrregião da baixada ocidental maranhense. A GEO se apresenta na forma de fragmentos rígidos e grânulos de consistência variável, coloração marrom escura, sabor amargo e ausência de odor marcante, conforme descrito por DUTRA *et al.* (2008) e CUNHA *et al.* (2015). Após a coleta, realizada com espátulas previamente esterilizadas, o material

foi armazenado a -20 °C até o preparo do extrato. A caracterização química dessa amostra de GEO foi previamente realizada por Araújo *et al.* (2015), utilizando técnicas cromatográficas. Este projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN - A605C04).

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

A amostra de GEO (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 do peso seco do extrato hidroalcoólico de GEO foi calculada (11 mg/mL). As soluções de trabalho de GEO foram utilizadas nas concentrações de 25 e 12,5 µg/mL e diluído em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com soro fetal bovino (10%, Cultilab).

A dexametasona (DEXA – 25 mg) foi obtida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e diluída em 10 mL de etanol absoluto e 10 mL de RPMI (KIM *et al.*, 2017). As concentrações utilizadas foram 10 e 5 µM.

A combinação de GEO com DEXA foi obtida utilizando as menores concentrações de cada tratamento (12, 5 µg/mL e 5 µM, respectivamente).

Outras concentrações de GEO e DEXA também foram analisadas em experimentos-piloto e, a partir dos melhores resultados obtidos, foram adotadas as concentrações descritas acima. Essas concentrações foram selecionadas com base em resultados prévios (HONORIO *et al.*, 2024) e na literatura científica.

### 3.3 Cultura de células THP-1

A linhagem de células monocíticas humanas THP-1 (*American Type Culture Collection* TIB-202) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil) e cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> contendo 20 ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina (Pen/strep, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e 0,5% de anfotericina B (ANFORICIN B®, Cristália), incubando a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas até obter 70-90% de confluência.

Por se tratar de uma linhagem celular humana imortalizada amplamente utilizada em

estudos experimentais *in vitro*, não houve necessidade de submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos, tendo sido o presente estudo dispensado de avaliação pelo sistema da Plataforma Brasil (CAAE: 35248620.0.0000.5411).

### 3.4 Diferenciação das células THP-1 monocíticas em macrófagos

As células THP-1 foram cultivadas conforme descrito acima e a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^5$  células/ml (300  $\mu$ l/poço) em microplacas de fundo chato de 24 poços. As células foram tratadas com PMA (20 ng/mL) e cultivadas a 37°C por 24 h. Após a diferenciação, as células seguiram para os demais ensaios.

Como forma complementar de validação da diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos, foi realizada a análise fenotípica por citometria de fluxo para detecção dos marcadores de superfície CD14 e CD11b, utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD14-PerCP Cy 5.5 (BD Bioscience™) e anti-CD11b-FITC (BD Bioscience™), respectivamente. Também foi analisada a morfologia celular após incubação com PMA, para avaliar a compatibilidade com o fenótipo do macrófago diferenciado.

### 3.5 Viabilidade celular

Após incubação prévia dos macrófagos com LPS por 2 h e posteriormente com GEO, DEXA e sua combinação por 18 h, 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 MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a formazan. Após incubação das culturas celulares com os diferentes tratamentos, a placa foi centrifugada por 10 min a 300 g e o sobrenadante foi removido, em seguida foram adicionados 300  $\mu$ L 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 300 g, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade ótica 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%.

### 3.6 Avaliação de marcadores de superfície celular

Após incubação de macrófagos com LPS por 2 h e os tratamentos (GEO, DEXA e a combinação) por 18 h, as células foram lavadas, ressuspensas em 1 mL de solução eletrolítica (ISOTON II) e incubadas com os anticorpos monoclonais fluoresceinados específicos: anti-TLR2-FITC (BD Bioscience™), anti-TLR4-PE (BD Bioscience™), anti-CD62L-PE-Cy7 (BD Bioscience™) e anti-CD80-Percp-Cy5.5 (BD Bioscience™) durante 30 minutos ao abrigo da luz a 4°C. Para cada teste, foi incluído um tubo controle contendo as células que foram incubadas com os anticorpos de controle isotópico (PE, FITC, PE-Cy7 ou Percp-Cy5.5). Após incubação por 20 minutos, as células foram lavadas, fixadas em 450 µL de ISOTON II contendo 50 µL de paraformaldeído 5% e analisadas em citômetro modelo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA), avaliando a mediana de intensidade de fluorescência (MIF), utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences, EUA), e analisadas pelo software FlowJo vX0.7, sendo adquiridos 30.000 eventos.

A pré-ativação das células com LPS por 2 h foi adotada com o objetivo de promover a ativação inicial dos macrófagos e o desencadeamento das vias de sinalização associadas aos PRRs, especialmente os receptores do tipo Toll, cuja ativação ocorre em escala de minutos a poucas horas após o estímulo inflamatório (AKIRA et al., 2006; MEDZHITOV, 2008; KAWAI & AKIRA, 2010)

### 3.7 Determinação da produção de citocinas

Após incubação de macrófagos com os tratamentos, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80°C. A determinação da concentração de TNF, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18, IL-33 e IL-10 foi realizada através de ensaio ELISA sanduíche (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando o sobrenadante coletado anteriormente. Inicialmente, foram adicionados 100 µL de solução salina isotônica tamponada com fosfato (PBS) pH7,2 e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R & D Systems, EUA) às placas de poliestireno (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 albumina sérica bovina (10%) (Sigma- Aldrich, EUA) em PBS para saturação dos sítios de ligação e, em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 h. A seguir, 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 e, ao anticorpo de detecção policlonal biotilado, foi adicionado o conjugado estreptoavidina-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 20 minutos a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 450 nm.

O período de incubação de 18 h após a adição dos tratamentos foi escolhido por ser compatível com os processos de transcrição gênica, tradução proteica e secreção de citocinas, bem como com a modulação de marcadores de superfície e proteínas intracelulares. Esse intervalo temporal permite a detecção de alterações funcionais estáveis induzidas pelos tratamentos, sem comprometer a viabilidade celular (DINARELLO, 2007; CHANPUT *et al.*, 2014).

### 3.8 Determinação da produção de metabólitos do ácido araquidônico

As concentrações de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> foram quantificadas utilizando o kit *Hydrogen Peroxide Assay* (Cayman Chemical, EUA) e os sobrenadantes dos macrófagos, após 2 h de incubação com LPS e posteriormente 3 h de tratamento com GEO, DEXA e a combinação. Para isso, foi utilizado o método de ELISA competitivo, baseado na competição entre os analitos presentes nas amostras e padrões conhecidos por sítios de ligação específicos. A intensidade da reação colorimétrica gerada foi inversamente proporcional à concentração dos mediadores nas amostras. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA e comprimento de onda de 412 nm.

Para a avaliação da produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub>, foram adotados tempos de incubação mais curtos, uma vez que esses mediadores são rapidamente sintetizados após a ativação celular. Esse processo está diretamente relacionado à ativação imediata de enzimas como a fosfolipase A<sub>2</sub>, COX e 5-LOX, não dependendo de eventos tardios de expressão gênica (RICCIOTTI *et al.*, 2011).

### 3.9 Atividade bactericida contra *S. aureus*

Após estímulo com LPS por 2 h, os macrófagos foram tratados com GEO, DEXA ou a combinação de ambos por 18 horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e as células aderentes foram incubadas por 90 minutos com uma suspensão da cepa bacteriana *S. aureus* ATCC 29213 (relação macrófago:bactéria = 1:20), em triplicata. Após esse período, os sobrenadantes foram novamente removidos e os macrófagos foram lisados com adição de água destilada estéril gelada (500 µL). Um alíquota de 100 µL do lisado foi então semeada em placas de Petri com meio BHI-ágar pelo método de pour plate. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h, e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas para cálculo da atividade bactericida com base na fórmula:

$$\text{Atividade Bactericida (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{UFC média experimental}}{\text{UFC média controle}} \right) \right] \times 100$$

### 3.10 Produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sobrenadante de cultura de macrófagos foi quantificada por método colorimétrico, utilizando o Kit de Ensaio de Peróxido de Hidrogênio (Cayman Chemical, EUA).

Após 3 h de tratamento com GEO, DEXA e sua combinação, as células foram centrifugadas a 300 g por 10 min, e foram adicionadas à placa de 96 poços juntamente com a curva padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionada uma solução enzimática contendo peroxidase e o substrato cromogênico 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP), que reage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente nas amostras. Essa reação gera um composto (resorufina), cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A absorbância foi lida a 570 nm.

O período de incubação de 3 h adotado, foi escolhido considerando que a produção de EROs ocorre de forma rápida após a ativação celular, estando diretamente associada à ativação imediata de enzimas oxidativas, como as NADPH oxidases. Dessa forma, tempos mais longos poderiam resultar na degradação do peróxido de hidrogênio ou na ativação de mecanismos compensatórios antioxidantes, dificultando a interpretação dos níveis reais de EROs induzidos pelos tratamentos ((BEDARD & KRAUSE, 2007; WINTERBOURN, 2013).

### 3.11 Análise proteômica

#### 3.11.1 Obtenção dos monócitos humanos

Amostras de sangue periférico foram obtidas de dois doadores adultos saudáveis, não fumantes, não obesos e sem histórico de consumo de álcool ou uso de medicamentos nos três dias anteriores à coleta, mediante consentimento informado. Foi coletado 80 mL de sangue, os quais foram distribuídos em tubos de 20 mL e heparinizados com 0,2 mL de heparina sódica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 200 g por 10 minutos.

Após a centrifugação, o plasma sanguíneo foi descartado e adicionaram-se 15 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) a cada tubo. As suspensões celulares foram cuidadosamente transferidas para tubos contendo 4 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Biosciences, Suécia) e submetidas à centrifugação de 300 g por 30 minutos, para separação das células por gradiente de densidade. O halo celular formado na interface plasma–Ficoll, correspondente às células mononucleares do sangue periférico (PBMC), foi coletado e submetido a duas lavagens sucessivas (300 g por 10 minutos), com remoção do sobrenadante e ressuspensão em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB.

A partir das PBMC obtidas, os monócitos foram isolados por seleção negativa utilizando beads magnéticas, conforme as instruções do fabricante do kit Classical Monocyte Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Alemanha). Esse método baseia-se na marcação e retenção, em coluna magnetizada, de células CD3<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup> e CD235a<sup>+</sup>, permitindo a coleta das células não marcadas, correspondentes aos monócitos.

Após o isolamento, os monócitos foram distribuídos em placas de 24 poços, na densidade de  $2 \times 10^6$  células/mL, em volume final de 250 µL por poço, e incubados a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas em cultura por 24 h na presença de GEO - 25 µg/mL, seguindo os protocolos experimentais descritos para a análise proteômica.

O período de incubação após o tratamento foi escolhido considerando que alterações detectáveis no proteoma celular refletem processos mais tardios e integrados da resposta inflamatória. Diferentemente da liberação rápida de mediadores solúveis, a modulação do perfil proteico envolve eventos cumulativos de regulação transcricional, tradução, modificações pós-traducionais, turnover proteico e reorganização funcional das vias celulares. Assim, o tempo de 24 h foi selecionado por permitir a consolidação dessas alterações moleculares, possibilitando a identificação de proteínas diferencialmente abundantes associadas à ativação, amplificação, resolução da inflamação e adaptação celular induzidas pela GEO. CAAE:

35248620.0.0000.5411

### 3.11.2 Extração de proteínas

Os monócitos foram ajustados para  $1 \times 10^5$  células/mL, tratados com GEO (25  $\mu\text{g/mL}$ ), lavados com PBS e centrifugados a 14.000 g por 30 min. Em seguida, os *pellets* foram solubilizados em 500  $\mu\text{L}$  tampão contendo ureia 8M, NaCl 25 mM, Tris 20 mM, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  na presença do coquetel de inibidores de proteases EASYpack *Protease Inhibitor Cocktail*. As amostras foram acondicionadas em microtubo estéril de 2 mL, com fundo cônico e base plana (Loccus, Brasil), juntamente com 7 *beads* de zircônio de 1,4 mm (Loccus, Brasil) e submetidas ao disruptor de células e tecidos (L-Beater 6 – Loccus, Brasil) utilizando 10 ciclos de 60 segundos, a 4350 g com pausa de 2 minutos no gelo entre os ciclos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 30 minutos, a 4°C e 9757 g. Após esta etapa, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

### 3.11.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit BioRad® *Protein Assay* (Loccus, Brasil), juntamente com quatro diluições da proteína padrão albumina bovina (BSA). As leituras de absorbância de cada amostra foram obtidas pelo espectrofotômetro  $\mu\text{Quant}$  em comprimento de onda 595 nm. Tanto as quatro diluições da proteína padrão quanto das amostras experimentais foram preparadas com 3 réplicas técnicas.

### 3.11.4 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para avaliar se durante o processo de extração não houve degradação das proteínas e também se a quantificação de proteínas representa de fato a presença das mesmas, foi realizada eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida em condições denaturantes e redutoras (LAEMMLI, 1970).

### 3.11.5 Digestão de proteínas em solução

A digestão de proteínas deste trabalho foi realizada segundo OLDRICH-NETO e colaboradores (2024). Cinquenta microgramas de cada amostra foram submetidas à etapa de digestão proteica. O volume correspondente a 50 µg foram separados em microtubos plásticos de baixa retenção do tipo Lobind (Eppendorf, Alemanha) e assim, procedeu-se à digestão triptica. As amostras foram complementadas com o tampão bicarbonato de amônio 50 mM (Merck, Alemanha) até que completassem 60 µL de volume final. Posteriormente, adicionou-se 25 µL da solução RapiGest SF 0,2% (Waters, Estados Unidos), as amostras foram agitadas em vórtex, centrifugadas e transferidas para um bloco aquecido a 37°C e incubadas por 60 min. Posteriormente foram adicionados 2,5 µL de ditioneitol (DTT) 100 mM (Merck, Alemanha), as amostras foram agitadas em vórtex, centrifugadas e colocadas em um bloco aquecido a 37°C, onde foram incubadas por 40 min. Após esta etapa adicionou-se 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM (Merck, Alemanha), as amostras foram agitadas em vórtex, centrifugadas e transferidas para um local escuro e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após estas etapas a tripsina (Promega, Estados Unidos) foi adicionada (1:50 [enzima:substrato]), incubando imediatamente a 37°C. Após 16 h, a reação enzimática foi interrompida com adição de 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) (Merck, Alemanha) e agitando em vórtex, centrifugando e incubando a 37°C por 90 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 9757 g, por 30 minutos e a temperatura ambiente. Os sobrenadantes de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo plástico de baixa retenção do tipo Lobind (Eppendorf, Alemanha). Após digestão triptica, as amostras foram dessalinizadas em colunas Sep-Pak Vac 1cc C18 (Waters, Estados Unidos) segundo as recomendações do fabricante e posteriormente foram secas em concentrador (Concentrator Plus – Eppendorf, Alemanha) por 24 h. Foram ressuspensas em 40 µL de ácido fórmico 0,1% (Merck, Alemanha) e tiveram seus peptídeos quantificados pelo método fluorimétrico Qubit (Thermo Fisher Scientific, Alemanha).

### 3.11.6 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 RSLnano (Thermo Fisher Scientific, Alemanha) acoplado a um equipamento de espectrometria de massas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, Alemanha). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B), ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 95% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30 µm x 5 mm (ThermoFisher Scientific, Alemanha), e

dessalinizados num gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 250 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica de 15 cm com 75  $\mu$ m de diâmetro interno, contendo partículas de C18 de 3 micrometros de diâmetro, utilizando um gradiente linear de 5 a 40% de B por 90 min à um fluxo de 250 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte EASY-IC<sup>TM</sup>. O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA (*Data-Dependent Acquisition*). Os espectros MS foram adquiridos de m/z 300 à m/z 1500, resolução de 120.000 e 50 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão de 30% com resolução de 15.000, 22 ms de tempo de injeção, 1.6 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 60s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

### 3.11.7 Análise dos dados

Os dados brutos de espectrometria de massas no formato *.RAW* foram submetidos ao software PatternLab [versão 4.0.0.84] (CARVALHO *et al.*, 2016) para a identificação das proteínas totais. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados UNIPROT UP000314981 (Taxonomy *Homo sapiens*), enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (grau de significância estatística) máxima foi considerada de  $\leq 1\%$ .

As análises comparativas de caráter qualitativo das proteínas entre as amostras foram obtidas pela ferramenta VIB/UGent *Bioinformatics & Evolutionary Genomics* pela opção Diagrama de Venn (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Uma matriz compatível com o programa MetaboAnalyst 4.0® (<https://www.metaboanalyst.ca/>) foi construída a partir dos dados proteômicos utilizando as contagens espectrais de cada proteína identificada, as quais foram normalizadas para cada proteína pela média ponderada das triplicatas técnicas de cada amostra (CHONG *et al.*, 2014). Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis* [PLS-DA]),  $p < 0,05$ ) foi utilizada como o principal método de análise multivariada. Apenas os sinais presentes em 50% das amostras foram considerados para a geração dos modelos estatísticos.

As análises de enriquecimento ontogenético foram obtidas pela ferramenta de bioinformática String (*String (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, <http://string-db.org/>), utilizando o banco de dados *Homo sapiens*, como organismo de referência, estratégias *experiments*, *database* e *coexpression*, dentro de um nível de confiança acima de 0.90 e p-value PPI de enriquecimento  $< 1.0\text{e-}16$ . As conexões entre os nós proteína-proteína representam sobreposição gênica e proximidade funcional, destacando os principais processos moleculares sob enriquecimento diferencial entre as amostras comparadas. Já os diagramas obtidos, evidenciam termos significativamente enriquecidos no conjunto proteico, agrupados segundo similaridade funcional. O tamanho dos círculos dos diagramas é proporcional ao número de genes associados a cada termo (Gene count), enquanto a escala de cores reflete o FDR, com valores mais baixos indicados em verde e valores mais elevados em azul.

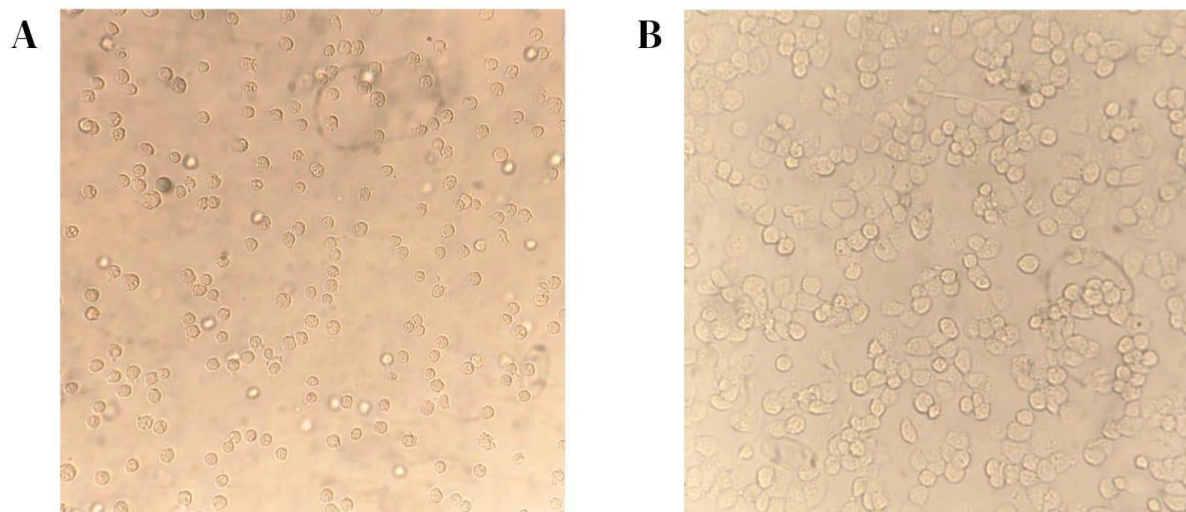
### 3.12 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada no software GraphPad Prism 8 (GraphPad, USA), utilizando Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. As comparações entre os grupos tratados (GEO, DEXA e associação) em relação aos grupos controle e LPS foram realizadas por meio do teste de comparações múltiplas de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Diferenciação das células THP-1 monocíticas em macrófagos

A avaliação dos marcadores CD11b e CD14 por citometria de fluxo mostrou-se inconclusiva, uma vez que a ausência de repetibilidade dos resultados impediu a obtenção de conclusões confiáveis sobre a diferenciação celular, tanto no grupo controle quanto nas células tratadas com PMA. Apesar disso, a observação morfológica por microscópio invertido indicou diferenciação celular, evidenciada pela adesão ao fundo da placa, característica ausente em células THP-1 em estado monocítico, e por alterações no formato celular, aumento do tamanho e espraçamento celular, com presença de prolongamentos citoplasmáticos, compatíveis com o fenótipo de macrófagos diferenciados (Figura 1).

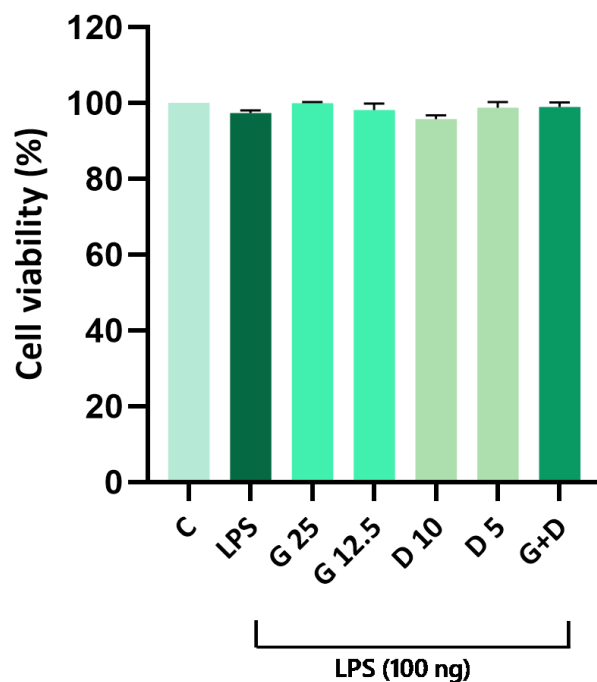


**Figura 1.** Morfologia celular antes (A) e após (B) incubação de células THP-1 com PMA (20 ng/mL) por 24 h. Aumento: 400 x no microscópio óptico invertido.

#### 4.2 Viabilidade Celular

A fim de verificar um possível efeito citotóxico dos tratamentos estudados, foi analisada a viabilidade celular pelo método da redução do MTT, após incubação de macrófagos previamente estimulados com LPS por 2 h e posteriormente com a GEO e DEXA isoladamente e em associação, após 18 h (Figura 2).

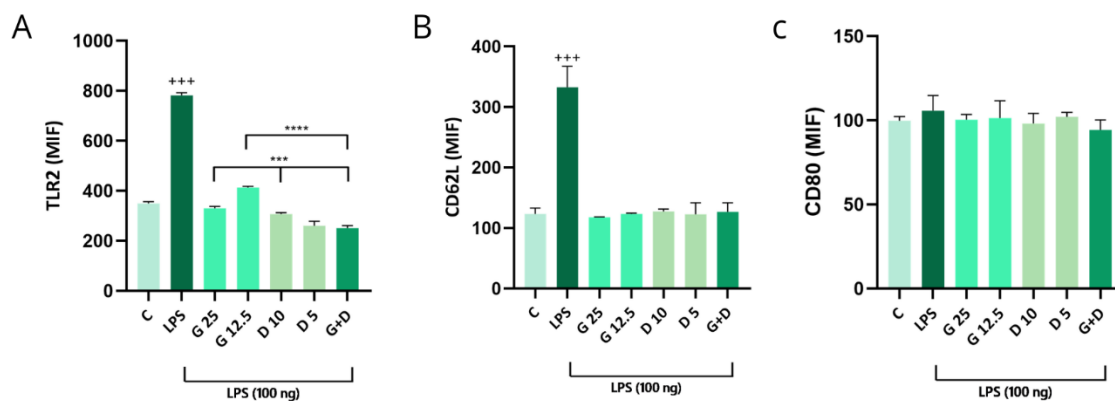
Conforme observado, nenhum dos tratamentos apresentou citotoxicidade sobre as células, sendo a viabilidade  $\geq 90\%$ .



**Figura 2.** Viabilidade (%) de macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguido de tratamento com meio RPMI 1640 (controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5  $\mu$ g/mL), dexametasona (D, 10 e 5  $\mu$ M) e associação (G 12,5 + D 5), por 18 h. Os dados representam a média  $\pm$  desvio-padrão de três experimentos similares.  $P > 0,05$ .

#### 4.3 Avaliação de marcadores de superfície celular

A Figura 3 apresenta a expressão dos marcadores de superfície celular TLR2, CD62L e CD80 expressos em MIF, em macrófagos tratados com GEO, DEXA ou com a combinação de ambos, sob estímulo inflamatório com LPS.



**Figura 3.** MIF de CD80 , CD62L e TRL2 em macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguido de tratamento com meio RPMI 1640 (controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5 µg/mL), dexametasona (D, 10 e 5 µM) e associação (G 12,5 + D 5) por 18 h. Os dados representam a média ± desvio-padrão (n = 3). +++ (P < 0,001) LPS vs todos os tratamentos. \*\*\*\* (P < 0,0001), \*\*\* (P < 0,001) vs G+D.

A análise dos marcadores de superfície (TLR2, CD62L e CD80) revelou padrões distintos de modulação. A expressão do TLR2 (Figura 3A), foi significativamente reduzida em todos os tratamentos quando comparados ao grupo estimulado apenas com LPS, além disso, observou-se maior efeito inibitório da combinação GEO + DEXA em relação a alguns tratamentos isolados, indicando possível influência sinérgica na modulação de receptores associados ao reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imunitária. Da mesma forma, na expressão de CD62L (Figura 3B), observou-se redução significativa em todos os grupos tratados com GEO, DEXA ou com a associação de ambos, alcançando níveis próximos aos do grupo controle, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. Em contrapartida, para CD80 (Figura 3C), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados.

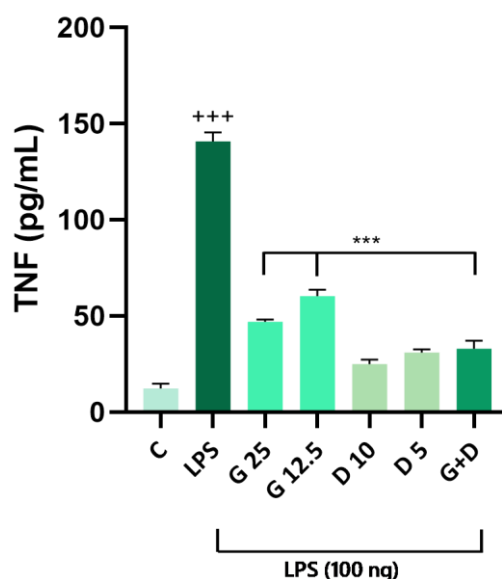
Em relação ao TLR4, não foram observados níveis detectáveis de expressão em macrófagos derivados da linhagem THP-1 em nenhum dos grupos analisados, independentemente do estímulo com LPS ou dos tratamentos com GEO, DEXA ou da associação de ambos (dados não mostrados). Dessa forma, não foi possível realizar análise estatística e comparativa para esse marcador no presente modelo experimental.

#### 4.4 Determinação da produção de citocinas

Com o intuito de observar o efeito dos tratamentos nas funções de macrófagos, foi avaliada a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias.

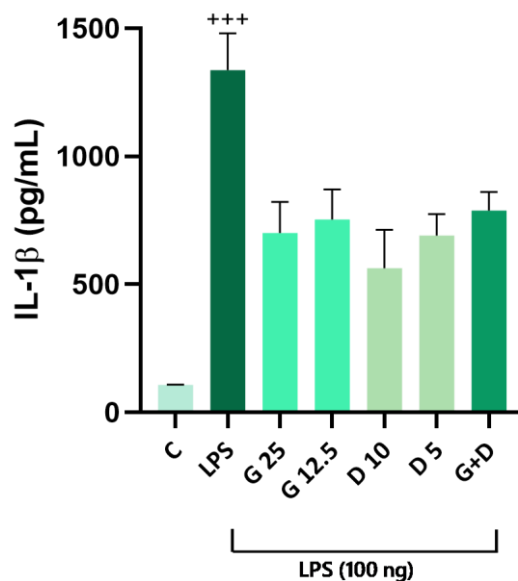
Na Figura 4 são apresentados os resultados da produção de TNF por macrófagos tratados com GEO e/ou DEXA, na presença de LPS. Conforme observado, a GEO (25 e 12,5 µg/mL) e a DEXA (10 e 5 µM) isoladamente, bem como a combinação (G 12,5 + D 5), inibiram a produção desta citocina em relação ao LPS e ao controle. A análise comparativa entre a combinação e os compostos isolados evidencia que a combinação GEO+DEXA reduziu significativamente o nível de TNF em comparação às duas concentrações de GEO 25 isoladas, indicando maior eficácia anti-inflamatória. Em relação à DEXA, não houve

diferença estatística entre a combinação e as concentrações de 10  $\mu$ M e 5  $\mu$ M, sugerindo que a associação pode alcançar efeito semelhante ao da GEO e de maiores doses de DEXA.



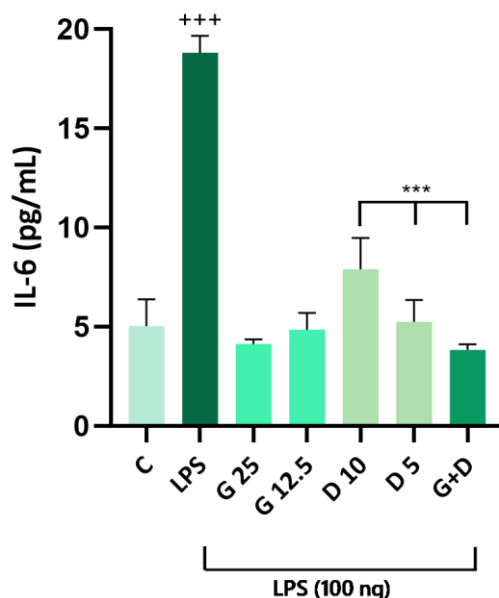
**Figura 4.** Produção de TNF (pg/mL) por macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguido de tratamento com meio RPMI 1640 (controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5  $\mu$ g/mL), dexametasona (D, 10 e 5  $\mu$ M) e associação (G 12,5 + D 5), por 18 h. Os dados representam a média  $\pm$  desvio-padrão (n = 3). +++ (P < 0,001) LPS vs todos os tratamentos. \*\*\* (P < 0,001) vs. G+D.

Na Figura 5 estão apresentados os resultados da produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos tratados com GEO e/ou DEXA, na presença de LPS. Conforme observado, todos os tratamentos (GEO 25 e 12,5  $\mu$ g/mL; DEXA 10 e 5  $\mu$ M) isoladamente e a combinação (G 12,5 + D 5) inibiram significativamente a produção desta citocina em relação ao LPS e ao controle. Não houve diferença estatística entre a combinação e os tratamentos isolados.



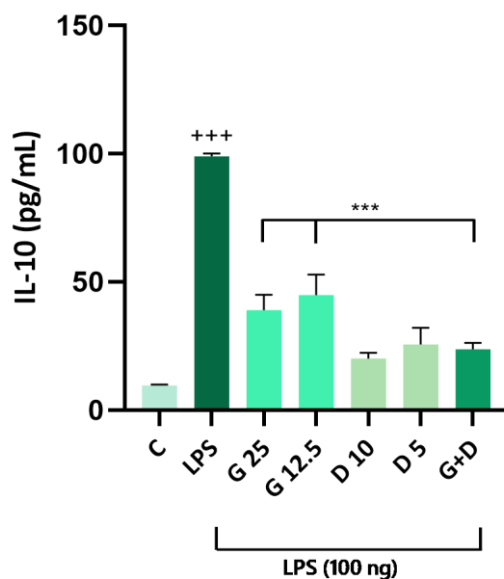
**Figura 5.** Produção de IL-1 $\beta$  (pg/mL) por macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguida de tratamento com meio RPMI 1640 (Controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5  $\mu$ g/mL), dexametasona (D, 10 e 5  $\mu$ M) e associação (G 12,5 + D 5) por 18 h. Os dados representam a média  $\pm$  desvio-padrão (n = 3). +++ (P < 0,001) LPS vs todos os tratamentos.

Os resultados referentes à produção de IL-6 por macrófagos tratados com GEO e/ou DEXA, na presença de LPS, estão apresentados na Figura 6. Todos os tratamentos (GEO 25 e 12,5  $\mu$ g/mL; DEXA 10 e 5  $\mu$ M) isoladamente e a combinação (G 12,5 + D 5) reduziram significativamente a produção de IL-6 em relação ao LPS. A análise comparativa da combinação com os tratamentos isolados evidencia que a combinação apresentou efeito muito semelhante aos isolados, com diferença estatística discreta indicando leve vantagem da combinação sobre a DEXA 10 e 5  $\mu$ M.



**Figura 6.** Produção de IL-6 (pg/mL) por macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguida de tratamento com meio RPMI 1640 (controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5 µg/mL), dexametasona (D, 10 e 5 µM) e associação (G 12,5 + D 5) por 18 h. Os dados representam a média ± desvio-padrão (n = 3). +++ (P < 0,001) LPS vs todos os tratamentos. \*\*\* (P < 0,001) vs. G+D.

A produção de IL-10 por macrófagos tratados com GEO e/ou DEXA, na presença de LPS, está presente na Figura 7. Todos os tratamentos (GEO 25 e 12,5 µg/mL; DEXA 10 e 5 µM) isoladamente e a combinação (G 12,5 + D 5) reduziram significativamente a produção desta citocina em comparação ao LPS e ao controle. A análise comparativa entre tratamentos mostrou que GEO 25 µg/mL e GEO 12,5 µg/mL apresentaram níveis de IL-10 significativamente maiores que a combinação, não havendo diferenças relevantes entre a combinação e as duas concentrações de DEXA.



**Figura 7.** Produção de IL-10 (pg/mL) por macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguida de tratamento com meio RPMI 1640 (controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5 µg/mL), dexametasona (D, 10 e 5 µM) e associação (G 12,5 + D 5) por 18 h. Os dados representam a média  $\pm$  desvio-padrão (n = 3). +++ (P < 0,001) LPS vs todos os tratamentos. \*\*\* (P < 0,001) vs. G+D.

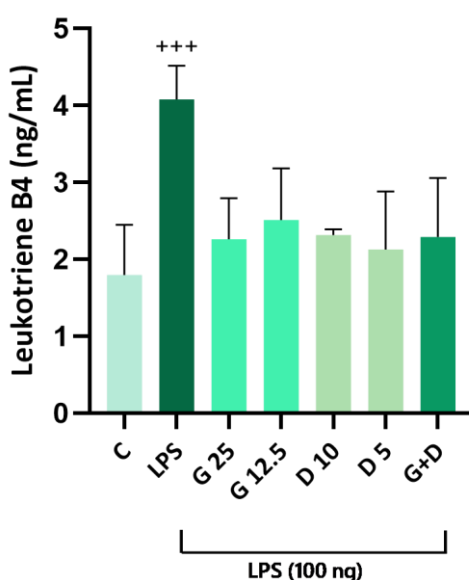
De forma geral, a análise comparativa entre os tratamentos isolados e a combinação GEO+DEXA demonstrou que, para a maioria das citocinas avaliadas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10), a associação apresentou efeito semelhante ou, em alguns casos, superior ao dos compostos administrados individualmente. Embora para determinadas citocinas, como IL-1 $\beta$ , não tenham sido detectadas diferenças estatísticas relevantes entre os grupos, em outros casos, como TNF e IL-6, a combinação manteve níveis de inibição comparáveis aos obtidos com concentrações mais altas de DEXA, sugerindo que é possível alcançar efeito anti-inflamatório robusto com menores doses do corticosteroide. Esses achados indicam o potencial sinérgico da GEO com a DEXA no controle da resposta inflamatória.

Neste trabalho, foi realizada também a dosagem de IL-8, IL-18 e IL-33 pela técnica de ELISA, porém não foi possível detectar a produção das mesmas, provavelmente por problemas técnicos.

#### 4.5 Determinação da produção de metabólitos do ácido araquidônico

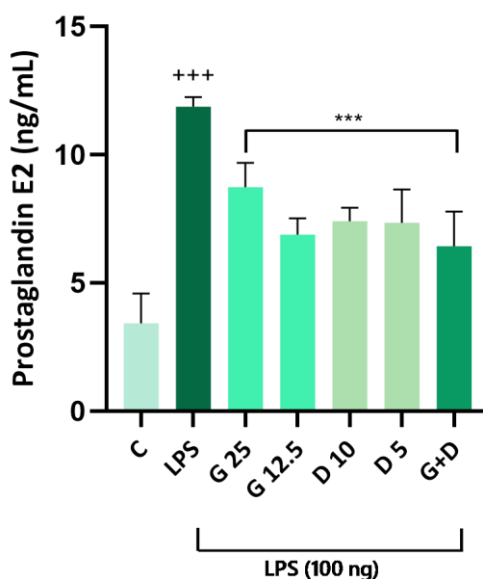
Para avaliar o efeito dos tratamentos quanto à produção de eicosanoides, foi avaliada a produção de prostaglandina E2 e leucotrieno B4.

A produção de LTB4 por macrófagos tratados com GEO e/ou DEXA, na presença de LPS, está apresentada na Figura 8. Houve diminuição significativa na produção de LTB4 quando as células foram incubadas com os tratamentos em comparação ao LPS. Não houve diferença estatística entre os tratamentos isolados e a combinação.



**Figura 8.** Produção de LTB4 (ng/mL) por macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguida de tratamento com meio RPMI 1640 (controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5 µg/mL), dexametasona (D, 10 e 5 µM) e associação (G 12,5 + D 5) por 3 h. Os dados representam a média ± desvio-padrão (n = 3). +++ (P < 0,001) LPS vs todos os tratamentos.

A Figura 9 apresenta os níveis de PGE2 produzidos por macrófagos após tratamento com GEO, DEXA ou sua associação, sob estímulo inflamatório com LPS. Todos os tratamentos reduziram significativamente a produção de PGE2 em relação tanto ao grupo controle quanto ao grupo estimulado apenas com LPS. Na comparação entre tratamentos isolados e a combinação, observou-se diferença estatística apenas para GEO 25 µg/mL, que apresentou menor inibição deste mediador em relação à combinação. Os demais tratamentos exibiram resultados semelhantes entre si.



**Figura 9.** Produção de PGE2 (ng/mL) por macrófagos incubados com LPS (100 ng/mL) por 2 h, seguida de tratamento com meio RPMI 1640 (controle - C), geoprópolis (G, 25 e 12,5 µg/mL), dexametasona (D, 10 e 5 µM) e associação (G 12,5 + D 5) por 3 h. Os dados representam a média ± desvio-padrão (n = 3). +++ (P < 0,001) LPS vs todos os tratamentos. \*\*\* (P < 0,001) vs. G+D.

Na avaliação dos eicosanoides (LTB4 e PGE2), observou-se que todos os tratamentos promoveram inibição significativa em relação ao grupo estimulado apenas com LPS. Em especial para a PGE2, a combinação GEO+DEXA apresentou redução mais pronunciada que a observada com GEO 25 µg/mL, enquanto para o LTB4 os efeitos foram semelhantes entre os diferentes grupos. Esses resultados sugerem que a associação pode potencializar a modulação de determinados mediadores lipídicos, o que pode contribuir para a redução do recrutamento e ativação de células inflamatórias.

#### 4.6 Atividade bactericida e geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

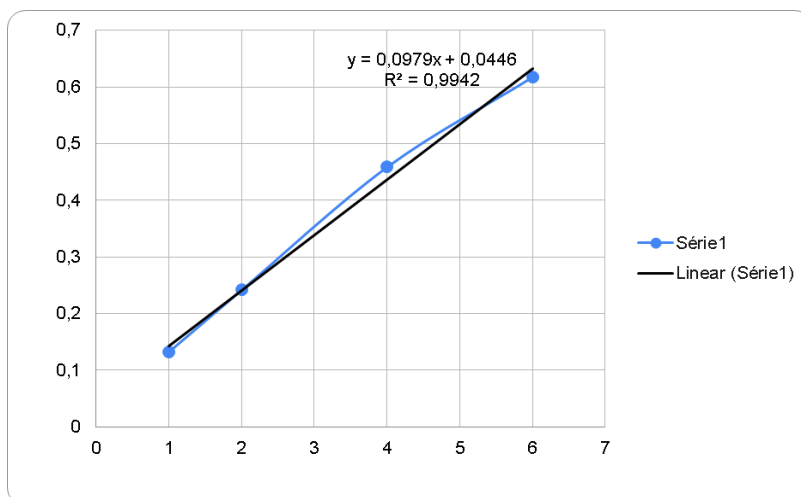
O ensaio de atividade bactericida foi realizado com o objetivo de avaliar se os tratamentos com GEO, DEXA ou sua combinação seriam capazes de afetar a ação fagocítica dos macrófagos. O ensaio de dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi conduzido para verificar o possível envolvimento deste metabólito na atividade bactericida dos macrófagos. No entanto, ambos os testes apresentaram ampla variabilidade entre as repetições, ausência de padrão reprodutível entre os grupos experimentais e inconsistência nos dados. Essas limitações inviabilizaram a análise estatística e a interpretação conclusiva dos resultados, motivo pelo qual esses dados não foram incluídos na tese.

#### 4.7 Análise proteômica de monócitos humanos tratados com geoprópolis

Embora os ensaios funcionais deste trabalho tenham sido realizados em macrófagos derivados da linhagem THP-1, a análise proteômica foi conduzida em monócitos humanos com o intuito de explorar, em um modelo primário, alterações moleculares associadas à ação anti-inflamatória da GEO. Essa abordagem permite avaliar proteínas e vias envolvidas nas etapas iniciais da resposta inflamatória, complementando os achados obtidos em macrófagos diferenciados e fornecendo uma visão integrada dos efeitos da GEO em diferentes níveis da imunidade inata.

Com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na ação anti-inflamatória da GEO, foi realizada análise proteômica exploratória em monócitos humanos tratados com a GEO (G) 25  $\mu\text{g/mL}$  e comparados ao grupo controle (C). A análise quantitativa baseou-se nas contagens espectrais das proteínas identificadas por espectrometria de massas, considerando apenas aquelas presentes em pelo menos 50% das amostras (controle e GEO).

A Figura 10 apresenta a curva de calibração utilizando a proteína padrão albumina como referência, em diferentes diluições, na etapa de quantificação de proteínas das amostras biológicas. Utilizando o coeficiente de conversão (equação da reta sob  $R^2 = 0,9942$ ), a concentração de proteínas em cada amostra foi obtida de forma satisfatória. A Tabela 1 evidencia a concentração proteica de cada amostra preparada.

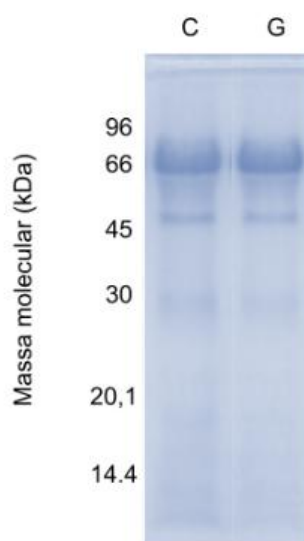


**Figura 10.** Diferentes diluições da proteína padrão albumina bovina para obtenção da curva padrão e o coeficiente de conversão por meio da equação da reta para quantificação de proteínas presentes nas amostras desconhecidas. Eixo y = Absorbância. Eixo x = Massa em  $\mu\text{g}$ .

**Tabela 1.** Quantificação de proteínas em extratos celulares preparados para análises proteômicas.

| <b>Amostra</b> | <b>Concentração (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>)</b> |
|----------------|------------------------------------------------------------|
| Controle       | 2,894450119                                                |
| Geoprópolis    | 2,397344229                                                |

Uma vez quantificado o conteúdo proteico de cada amostra, 20  $\mu\text{g}$  de proteínas foram submetidos a um gel de eletroforese SDS-PAGE unidimensional (Figura 11). A partir dos perfis proteicos de cada amostra, foi possível visualizar bandas definidas, ausência de arrastos verticais, sem sinais de degradação proteica, indicando a boa condição das amostras para prosseguir o processamento das mesmas. Nota-se que as amostras são misturas complexas, apresentando proteínas mais abundantes entre aquelas com massa molecular em torno de 45 a 96 kDa.

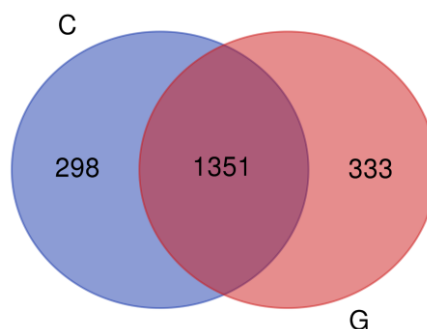


**Figura 11.** Perfil protéico de células controle (C) e de células tratadas com geoprópolis (G).

Após digestão proteica das amostras, os fragmentos peptídicos foram submetidos às análises de espectrometria de massas. Por meio das análises de bioinformática pela ferramenta PatternLab, hits proteicos totais foram identificados nas amostras para avaliar os principais parâmetros proteômicos de cada proteína identificada, segundo o Locus (Código de Acesso no banco de dados Uniprot), massa molecular, peptídeos únicos, contagem espectral, índice de abundância (NSAF), cobertura, score de identificação da proteína (pontuação na análise) e

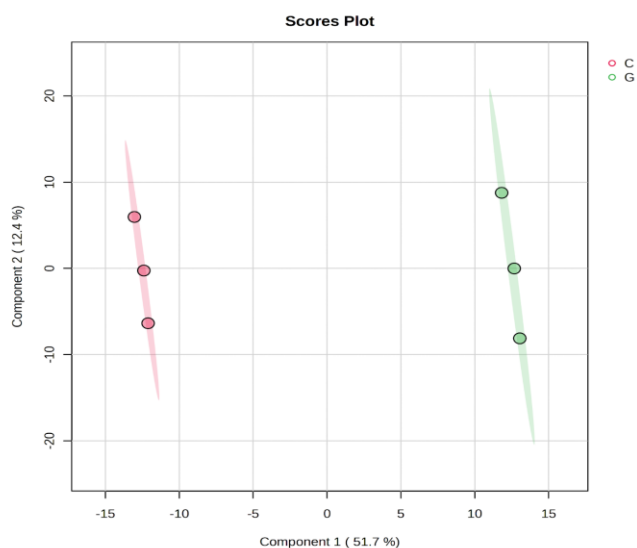
descrição (nome da proteína no banco de dados) em cada amostra.

Comparando a amostra C com a amostra G, 1351 proteínas comuns foram encontradas entre as amostras C e G, sendo 298 proteínas exclusivas da amostra C e 333 proteínas exclusivas da amostra G (Figura 12).

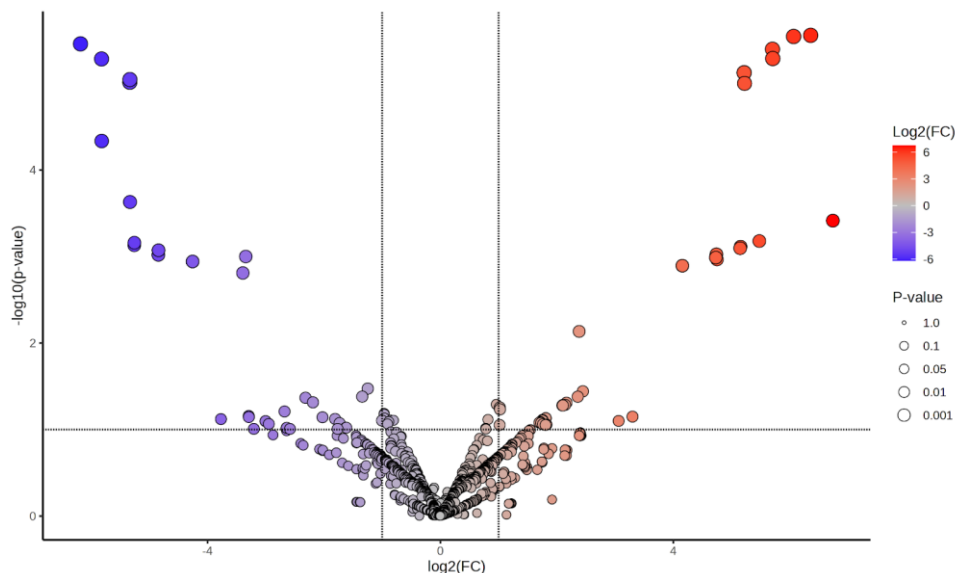


**Figura 12.** Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas nas amostras de monócitos controle (C) e tratados com geoprópolis (G).

A matriz obtida a partir dos parâmetros proteômicos quantitativos foi submetida à análise estatística multivariada no software MetaboAnalyst®, utilizando a Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA), a qual evidenciou uma separação clara entre os grupos C e G, indicando modificações significativas no perfil proteômico dos monócitos expostos à GEO (Figura 13). A análise tipo volcano plot (Figura 14) confirmou a presença de proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos, com variações significativas ( $p < 0,05$ ;  $FC > 2$ ).



**Figura 13.** Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais (*Partial Least Squares Discriminant Analysis* [PLS-DA]) do proteoma presente no extrato celular da amostra C e da amostra G ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Análise Volcano Plot das proteínas diferencialmente abundantes nos extratos celulares quando comparamos a amostra C com a amostra G. Direção da comparação: G/C. Pontos azuis: proteínas *down-regulated* na amostra G em relação à amostra C. Pontos vermelhos: proteínas *up-regulated* na amostra G em relação à amostra C.

As análises comparativas mostraram que 127 proteínas se apresentam diferencial e quantitativamente abundantes por cumprirem necessariamente o critério estatístico  $p \leq 0,05$  e o critério matemático *fold change*  $\geq 2.0$  (Tabela 2).

**Tabela 2.** Proteínas diferencialmente abundantes nos extratos celulares da amostra G quando na comparada com a amostra C ( $p \leq 0,05$  e *fold change*  $\geq 2.0$ ). Proteínas nas linhas azuis: proteínas *down-regulated* na amostra G em relação à amostra C. Proteínas nas linhas verdes: proteínas *up-regulated* na amostra G em relação à amostra C.

|                   | FC       | log2(FC) | raw.pval | -log10(p) | Proteína                   |
|-------------------|----------|----------|----------|-----------|----------------------------|
| <b>F8W1S1</b>     | 0.013769 | -61.824  | 3,48E-02 | 54.578    | Keratin 74                 |
| <b>Q8WUD1</b>     | 0.017688 | -58.211  | 5,20E-02 | 52.838    | Ras-related protein Rab-2B |
| <b>P09601</b>     | 0.017722 | -58.183  | 4,62E-01 | 43.351    | Heme oxygenase 1           |
| <b>A0A2R8Y7Y4</b> | 0.024758 | -53.359  | 9,69E-02 | 50.137    | Ankyrin repeat domain 44   |

|                   | FC       | log2(FC) | raw.pval   | -log10(p) | Proteína                                                     |
|-------------------|----------|----------|------------|-----------|--------------------------------------------------------------|
| <b>A0A499FI31</b> | 0.024758 | -53.359  | 9,69E-02   | 50.137    | Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3      |
| <b>O00743</b>     | 0.024758 | -53.359  | 9,69E-02   | 50.137    | Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit     |
| <b>P55263</b>     | 0.024758 | -53.359  | 9,69E-02   | 50.137    | Adenosine kinase                                             |
| <b>Q93084</b>     | 0.024758 | -53.359  | 9,69E-02   | 50.137    | Sarcoplasmic/endo plasmic reticulum calcium ATPase 3         |
| <b>Q9UHL4</b>     | 0.024758 | -53.359  | 9,69E-02   | 50.137    | Dipeptidyl peptidase 2                                       |
| <b>Q9Y3D6</b>     | 0.024758 | -53.359  | 9,69E-02   | 50.137    | Mitochondrial fission 1 protein                              |
| <b>A0A0B4J231</b> | 0.024825 | -53.321  | 0.00023437 | 36.301    | Immunoglobulin lambda like polypeptide 5                     |
| <b>A0A3B3ITM0</b> | 0.026116 | -52.589  | 0.00074158 | 31.298    | Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1      |
| <b>P0DOY3</b>     | 0.026153 | -52.569  | 0.00069302 | 31.593    | Immunoglobulin lambda constant 3                             |
| <b>G3V1B3</b>     | 0.034805 | -48.445  | 0.000958   | 30.186    | 60S ribosomal protein L21                                    |
| <b>Q9H098</b>     | 0.034805 | -48.445  | 0.000958   | 30.186    | Protein FAM107B                                              |
| <b>J3KQ66</b>     | 0.034871 | -48.418  | 0.00084656 | 30.723    | Reelin                                                       |
| <b>P62633</b>     | 0.034871 | -48.418  | 0.00084656 | 30.723    | CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein           |
| <b>Q9BV40</b>     | 0.034871 | -48.418  | 0.00084656 | 30.723    | Vesicle-associated membrane protein 8                        |
| <b>A0A087WXR5</b> | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417  | 29.424    | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5 |

|                   | FC       | log2(FC) | raw.pval  | -log10(p) | Proteína                                                   |
|-------------------|----------|----------|-----------|-----------|------------------------------------------------------------|
| <b>A0A8I5KU53</b> | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | Myosin light chain kinase, smooth muscle                   |
| <b>O15212</b>     | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | Prefoldin subunit 6                                        |
| <b>O75348</b>     | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | V-type proton ATPase subunit G 1                           |
| <b>P32455</b>     | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | Guanylate-binding protein 1                                |
| <b>P49006</b>     | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | MARCKS-related protein                                     |
| <b>P52434</b>     | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3 |
| <b>Q9H4A4</b>     | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | Aminopeptidase B                                           |
| <b>Q9Y3F4</b>     | 0.052306 | -42.569  | 0.0011417 | 29.424    | Serine-threonine kinase receptor-associated protein        |
| <b>H0YIN9</b>     | 0.073294 | -37.702  | 0.075739  | 11.207    | Keratin 5                                                  |
| <b>A0A5H1ZRQ3</b> | 0.095138 | -33.938  | 0.0015499 | 28.097    | Immunoglobulin kappa constant                              |
| <b>P13647</b>     | 0.098493 | -33.438  | 0.0010001 | 3         | Keratin, type II cytoskeletal 5                            |
| <b>O43809</b>     | 0.10215  | -32.913  | 0.071742  | 11.442    | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5  |
| <b>F8WEW2</b>     | 0.10841  | -32.054  | 0.098276  | 10.076    | Actin related protein 3                                    |
| <b>A0A7P0T8N8</b> | 0.12469  | -30.036  | 0.080034  | 10.967    | Transcription elongation regulator 1                       |
| <b>O75131</b>     | 0.12469  | -30.036  | 0.080034  | 10.967    | Copine-3                                                   |
| <b>P30536</b>     | 0.12469  | -30.036  | 0.080034  | 10.967    | Translocator protein                                       |
| <b>P51610</b>     | 0.12469  | -30.036  | 0.080034  | 10.967    | Host cell factor 1                                         |

|               | FC       | log2(FC) | raw.pval | -log10(p) | Proteína                                                           |
|---------------|----------|----------|----------|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>P35908</b> | 0.15628  | -26.778  | 0.061836 | 12.088    | Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal                          |
| <b>Q12874</b> | 0.16029  | -26.412  | 0.095596 | 10.196    | Splicing factor 3A subunit 3                                       |
| <b>Q13162</b> | 0.16045  | -26.398  | 0.095543 | 10.198    | Peroxiredoxin-4                                                    |
| <b>Q9Y5B9</b> | 0.16045  | -26.398  | 0.095543 | 10.198    | FACT complex subunit SPT16                                         |
| <b>Q5T4U5</b> | 0.16672  | -25.845  | 0.098382 | 10.071    | Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial        |
| <b>P12259</b> | 0.20063  | -23.174  | 0.042922 | 13.673    | Coagulation factor V                                               |
| <b>Q9HB71</b> | 0.21921  | -21.896  | 0.048503 | 13.142    | Calcyclin-binding protein                                          |
| <b>P40197</b> | 0.24556  | -20.258  | 0.072091 | 11.421    | Platelet glycoprotein V                                            |
| <b>P27105</b> | 0.2853   | -18.094  | 0.075339 | 1.123     | Stomatin                                                           |
| <b>R4GNE4</b> | 0.30095  | -17.324  | 0.084164 | 10.749    | Glutathione peroxidase                                             |
| <b>K7EM85</b> | 0.32471  | -16.228  | 0.0951   | 10.218    | Rho GTPase-activating protein 45                                   |
| <b>P62263</b> | 0.32604  | -16.169  | 0.095252 | 10.211    | Small ribosomal subunit protein uS11                               |
| <b>O00479</b> | 394      | -13.437  | 0.041645 | 13.804    | High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 4 |
| <b>F5GXT1</b> | 0.42093  | -12.483  | 0.033648 | 1.473     | Tetraspanin                                                        |
| <b>P16949</b> | 0.49853  | -10.042  | 0.078747 | 11.038    | Stathmin                                                           |
| <b>O14618</b> | 0.024791 | -5.334   | 9,00E-02 | 50.458    | Copper chaperone for superoxide dismutase                          |
| <b>P15924</b> | 0.024791 | -5.334   | 9,00E-02 | 50.458    | Desmoplakin                                                        |

|                   | FC       | log2(FC) | raw.pval  | -log10(p) | Proteína                                                          |
|-------------------|----------|----------|-----------|-----------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>Q13242</b>     | 0.024791 | -5.334   | 9,00E-02  | 50.458    | Serine/arginine-rich splicing factor 9                            |
| <b>E9PB61</b>     | 0.10202  | -3.293   | 0.069707  | 11.567    | Aly/REF export factor                                             |
| <b>P61019</b>     | 0.12959  | -2.948   | 0.086204  | 10.645    | Ras-related protein Rab-2A                                        |
| <b>Q15424</b>     | 0.29402  | -1.766   | 0.098255  | 10.076    | Scaffold attachment factor B1                                     |
| <b>P17096</b>     | 20.236   | 1.017    | 0.088542  | 10.529    | High mobility group protein HMG-I/HMG-Y                           |
| <b>P50570</b>     | 52.162   | 2.383    | 0.0073362 | 21.345    | Dynamin-2                                                         |
| <b>P15170</b>     | 20.281   | 10.202   | 0.05561   | 12.548    | Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A |
| <b>Q86VP6</b>     | 20.326   | 10.234   | 0.058451  | 12.332    | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1                     |
| <b>P05141</b>     | 32.481   | 16.996   | 0.083282  | 10.794    | ADP/ATP translocase 2                                             |
| <b>Q9Y265</b>     | 32.813   | 17.143   | 0.081872  | 10.869    | RuvB-like 1                                                       |
| <b>A0A0G2JH46</b> | 33.125   | 17.279   | 0.084081  | 10.753    | Major histocompatibility complex, class II, DR alpha              |
| <b>P02649</b>     | 33.702   | 17.528   | 0.07753   | 11.105    | Apolipoprotein E                                                  |
| <b>P25774</b>     | 33.702   | 17.528   | 0.07753   | 11.105    | Cathepsin S                                                       |
| <b>O95831</b>     | 33.702   | 17.528   | 0.078866  | 11.031    | Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial                        |
| <b>P63167</b>     | 33.765   | 17.555   | 0.078089  | 11.074    | Dynein light chain 1, cytoplasmic                                 |
| <b>K7ERI8</b>     | 33.892   | 17.609   | 0.086755  | 10.617    | Ras-related protein Rab-5C                                        |

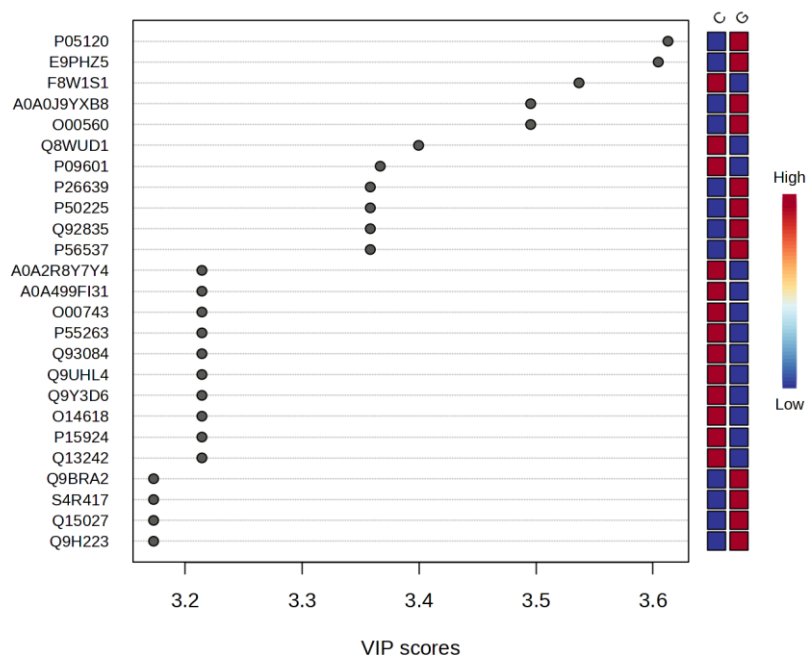
|                   | FC     | log2(FC) | raw.pval  | -log10(p) | Proteína                                                       |
|-------------------|--------|----------|-----------|-----------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Q9Y2S6</b>     | 34.954 | 18.055   | 0.08861   | 10.525    | Translation machinery-associated protein 7                     |
| <b>A0A0B4J2C3</b> | 35.049 | 18.094   | 0.073954  | 1.131     | Translationally-controlled tumor protein                       |
| <b>H3BNC9</b>     | 35.049 | 18.094   | 0.073954  | 1.131     | Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1          |
| <b>P17931</b>     | 35.049 | 18.094   | 0.073954  | 1.131     | Galectin-3                                                     |
| <b>P50452</b>     | 35.339 | 18.212   | 0.087629  | 10.574    | Serpin B8                                                      |
| <b>P51659</b>     | 42.728 | 20.952   | 0.05271   | 12.781    | Peroxisomal multifunctional enzyme type 2                      |
| <b>P29466</b>     | 42.848 | 20.992   | 0.052221  | 12.822    | Caspase-1                                                      |
| <b>O95372</b>     | 42.943 | 21.024   | 0.052731  | 12.779    | Acyl-protein thioesterase 2                                    |
| <b>O75533</b>     | 44.101 | 21.408   | 0.051811  | 12.856    | Splicing factor 3B subunit 1                                   |
| <b>P07602</b>     | 44.838 | 21.647   | 0.048992  | 13.099    | Prosaposin                                                     |
| <b>C9JH19</b>     | 51.284 | 23.585   | 0.041739  | 13.795    | Cathepsin D                                                    |
| <b>P01344</b>     | 5.45   | 24.462   | 0.036188  | 14.414    | Insulin-like growth factor 2                                   |
| <b>Q9NVJ2</b>     | 83.447 | 30.609   | 0.079507  | 10.996    | ADP-ribosylation factor-like protein 8B                        |
| <b>A0A7I2V3S3</b> | 98.418 | 32.989   | 0.070931  | 11.492    | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E           |
| <b>A0A0A6YYL2</b> | 17.821 | 41.555   | 0.0012767 | 28.939    | Sulfotransferase                                               |
| <b>A0A9L9PXM7</b> | 17.821 | 41.555   | 0.0012767 | 28.939    | cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit |

|                   | FC     | log2(FC) | raw.pval   | -log10(p) | Proteína                                               |
|-------------------|--------|----------|------------|-----------|--------------------------------------------------------|
| <b>A2RTX5</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Threonine--tRNA ligase 2, cytoplasmic                  |
| <b>E9PGA6</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 |
| <b>P01011</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Alpha-1-antichymotrypsin                               |
| <b>P54709</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3    |
| <b>P56385</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | ATP synthase F(0) complex subunit e, mitochondrial     |
| <b>P62899</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Large ribosomal subunit protein eL31                   |
| <b>Q08495</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Dematin                                                |
| <b>Q08AF3</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Schlafen family member 5                               |
| <b>Q8WUW1</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | Protein BRICK1                                         |
| <b>Q96IX5</b>     | 17.821 | 41.555   | 0.0012767  | 28.939    | ATP synthase F(0) complex subunit k, mitochondrial     |
| <b>A0A8V8TNU3</b> | 26.55  | 47.307   | 0.0010292  | 29.875    | Cytoplasmic FMR1-interacting protein                   |
| <b>H0YHG0</b>     | 26.55  | 47.307   | 0.0010292  | 29.875    | DnaJ homolog subfamily C member 14                     |
| <b>Q9Y6B6</b>     | 26.55  | 47.307   | 0.0010292  | 29.875    | Small COPII coat GTPase SAR1B                          |
| <b>P14222</b>     | 26.732 | 47.405   | 0.00094322 | 30.254    | Perforin-1                                             |
| <b>P36543</b>     | 26.732 | 47.405   | 0.00094322 | 30.254    | V-type proton ATPase subunit E 1                       |

|                   | FC     | log2(FC) | raw.pval   | -log10(p) | Proteína                                                                |
|-------------------|--------|----------|------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>P48147</b>     | 26.732 | 47.405   | 0.00094322 | 30.254    | Prolyl endopeptidase                                                    |
| <b>Q92973</b>     | 26.732 | 47.405   | 0.00094322 | 30.254    | Transportin-1                                                           |
| <b>P12544</b>     | 26.914 | 47.503   | 0.0010825  | 29.656    | Granzyme A                                                              |
| <b>P19961</b>     | 35.461 | 51.482   | 0.00080256 | 30.955    | Alpha-amylase 2B                                                        |
| <b>B0QY90</b>     | 35.643 | 51.555   | 0.00077034 | 31.133    | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L                    |
| <b>Q16401</b>     | 35.643 | 51.555   | 0.00077034 | 31.133    | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5                          |
| <b>A0A0C4DFN3</b> | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | Monoglyceride lipase                                                    |
| <b>A0A6Q8PF87</b> | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | Apoptosis inducing factor mitochondria associated 1                     |
| <b>A0A7I2V3V0</b> | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | Signal transducer and activator of transcription                        |
| <b>O00233</b>     | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9                          |
| <b>P15144</b>     | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | Aminopeptidase N                                                        |
| <b>P46926</b>     | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | Glucosamine-6-phosphate deaminase 1                                     |
| <b>P51812</b>     | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | Ribosomal protein S6 kinase alpha-3                                     |
| <b>P61081</b>     | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | NEDD8-conjugating enzyme Ubc12                                          |
| <b>Q15027</b>     | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1 |
| <b>Q9H223</b>     | 37.186 | 52.167   | 7,51E-02   | 51.246    | EH domain-containing protein 4                                          |

|                   | FC     | log2(FC) | raw.pval   | -log10(p) | Proteína                                                   |
|-------------------|--------|----------|------------|-----------|------------------------------------------------------------|
| <b>Q9BRA2</b>     | 37.368 | 52.237   | 9,97E-02   | 50.011    | Thioredoxin domain-containing protein 17                   |
| <b>S4R417</b>     | 37.368 | 52.237   | 9,97E-02   | 50.011    | 40S ribosomal protein S15                                  |
| <b>P11717</b>     | 44.553 | 54.775   | 0.00066264 | 31.787    | Cation-independent mannose-6-phosphate receptor            |
| <b>P56537</b>     | 52.097 | 57.031   | 4,01E-02   | 53.964    | Eukaryotic translation initiation factor 6                 |
| <b>P26639</b>     | 52.278 | 57.081   | 5,15E-02   | 52.882    | Threonine--tRNA ligase 1, cytoplasmic                      |
| <b>P50225</b>     | 52.278 | 57.081   | 5,15E-02   | 52.882    | Sulfotransferase 1A1                                       |
| <b>Q92835</b>     | 52.278 | 57.081   | 5,15E-02   | 52.882    | Phosphatidylinositol 1 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 |
| <b>A0A0J9YXB8</b> | 67.007 | 60.662   | 2,86E-02   | 55.432    | Prosaposin                                                 |
| <b>O00560</b>     | 67.007 | 60.662   | 2,86E-02   | 55.432    | Syntenin-1                                                 |
| <b>E9PHZ5</b>     | 82.1   | 63.593   | 2,78E-02   | 55.563    | Cathepsin B                                                |
| <b>P05120</b>     | 106.93 | 67.405   | 0.0003849  | 34.147    | Plasminogen activator inhibitor 2                          |

Para fornecer um suporte maior aos dados obtidos das proteínas diferencialmente abundantes pela ferramenta Volcano Plot, foram realizadas análises de Vip Score, as quais indicam quais proteínas com VIP Score  $\geq 1.0$  apresentam padrões de variações/padrões de mudança de expressão similar às proteínas validadas pela análise de Volcano Plot (Figura 15; Tabela 3). Esta análise estatística é muito utilizada pela comunidade proteômica para auxiliar na melhor compreensão da problemática biológica do estudo, por se tratar de proteínas que atuam de forma sinérgica no tratamento proposto.



**Figura 15.** Gráfico de projeção de importância variável [PLSDA] evidenciando as primeiras 25 proteínas com VIP Score > 1.0 identificadas na análise por apresentarem padrões de variações similares entre si. As caixas coloridas à direita indicam a abundância relativa das proteínas correspondentes para as proteínas nos extratos celulares das amostras G e C.

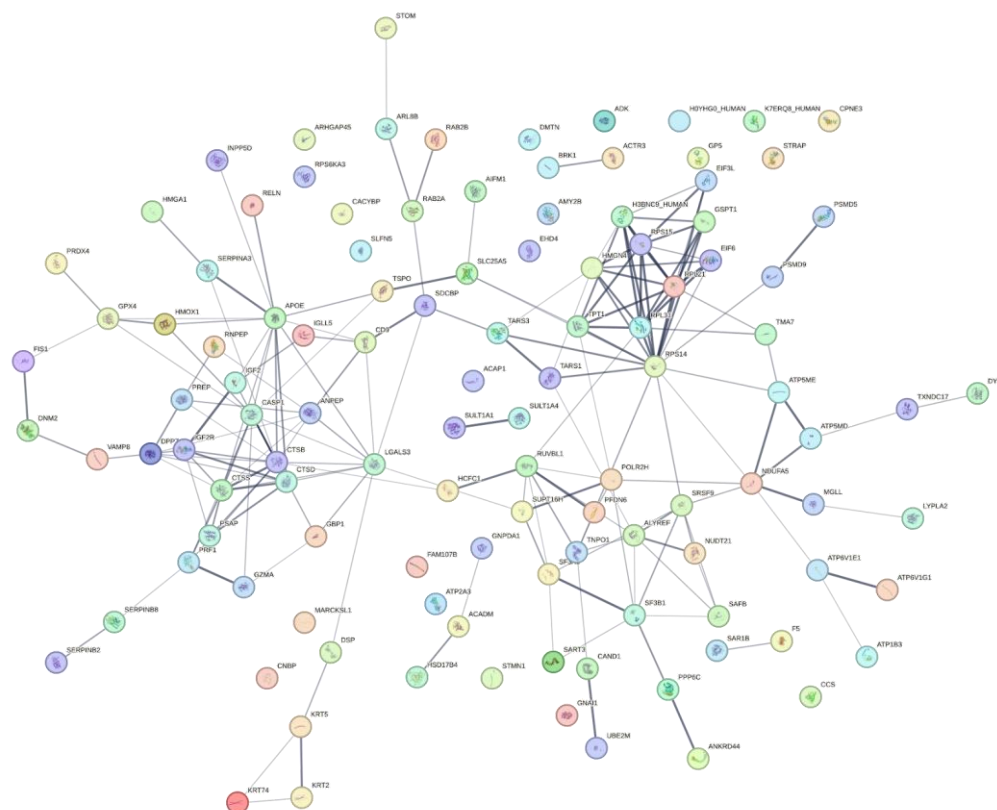
**Tabela 3.** Proteínas identificadas como diferencialmente expressas com VIP Score > 1.0 pela análise de projeção de importância variável [PLSDA] entre a amostra G e a amostra C.

| Access Code | Vip Score | Proteína                              |
|-------------|-----------|---------------------------------------|
| P05120      | 3.6008    | Plasminogen activator inhibitor 2     |
| E9PHZ5      | 3.5925    | Cathepsin B                           |
| F8W1S1      | 3.5251    | Keratin 74                            |
| A0A0J9YXB8  | 3.4838    | Prosaposin                            |
| O00560      | 3.4838    | Syntenin-1                            |
| Q8WUD1      | 3.3885    | Ras-related protein Rab-2B            |
| P09601      | 3.3558    | Heme oxygenase 1                      |
| P26639      | 3.3472    | Threonine--tRNA ligase 1, cytoplasmic |
| P50225      | 3.3472    | Sulfotransferase 1A1                  |

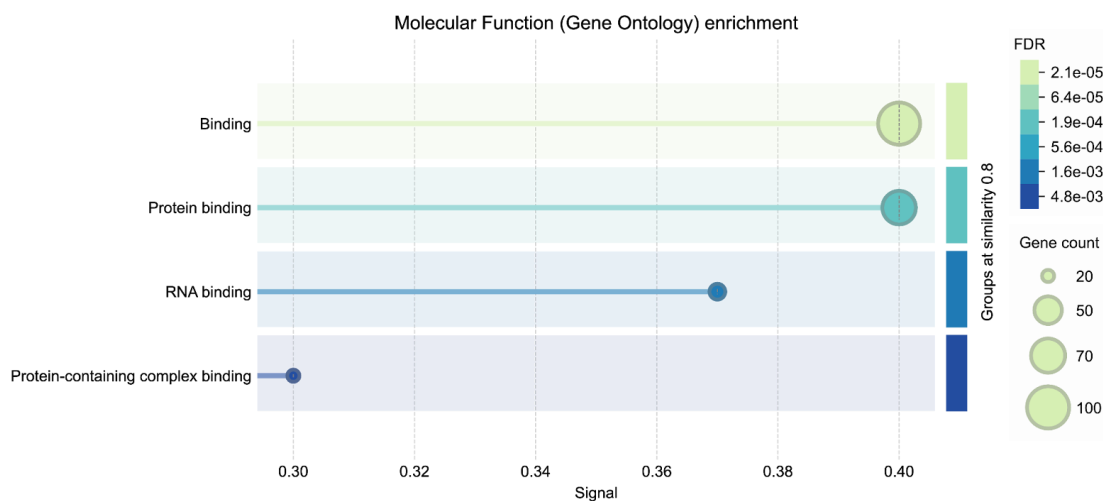
|                        |        |                                                             |
|------------------------|--------|-------------------------------------------------------------|
| <b>Q92835</b>          | 3.3472 | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase<br>1 |
| <b>P56537</b>          | 3.3472 | Eukaryotic translation initiation factor 6                  |
| <b>A0A2R8<br/>Y7Y4</b> | 3.2039 | Ankyrin repeat domain 44                                    |
| <b>A0A499F<br/>I31</b> | 3.2039 | Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells<br>3  |
| <b>O00743</b>          | 3.2039 | Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit    |
| <b>P55263</b>          | 3.2039 | Adenosine kinase                                            |
| <b>Q93084</b>          | 3.2039 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3         |
| <b>Q9UHL4</b>          | 3.2039 | Dipeptidyl peptidase 2                                      |
| <b>Q9Y3D6</b>          | 3.2039 | Mitochondrial fission 1 protein                             |
| <b>O14618</b>          | 3.2039 | Copper chaperone for superoxide dismutase                   |
| <b>P15924</b>          | 3.2039 | Desmoplakin                                                 |
| <b>Q13242</b>          | 3.2039 | Serine/arginine-rich splicing factor 9                      |
| <b>Q9BRA2</b>          | 3.1626 | Thioredoxin domain-containing protein 17                    |
| <b>S4R417</b>          | 3.1626 | 40S ribosomal protein S15                                   |
| <b>A0A0C4<br/>DFN3</b> | 3.1626 | Monoglyceride lipase                                        |
| <b>A0A6Q8<br/>PF87</b> | 3.1626 | Apoptosis inducing factor mitochondria associated 1         |

Uma vez indicadas as proteínas diferencialmente abundantes entre a amostra G e a amostra C (Tabela 3), levando em consideração o impacto causado pelo tratamento em G, foi possível evidenciar as principais interações proteínas-proteínas existentes que possibilitam melhor compreender as funções biológicas, processos biológicos, localização celular e as vias de sinalização que são afetadas/alteradas pelo tratamento da amostra G (Figuras 16 a 20). Por meio da ferramenta de bioinformática String (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*), foi possível avaliar as anotações funcionais das proteínas diferencialmente abundantes entre a amostra G e a amostra C. Os diagramas de enriquecimento funcional gerados pela ferramenta STRING trazem as seguintes características: o tamanho dos círculos representa o número de genes associados a cada termo enriquecido. A posição horizontal dos círculos indica a razão de enriquecimento (proporção de genes observados em relação ao esperado). A cor de

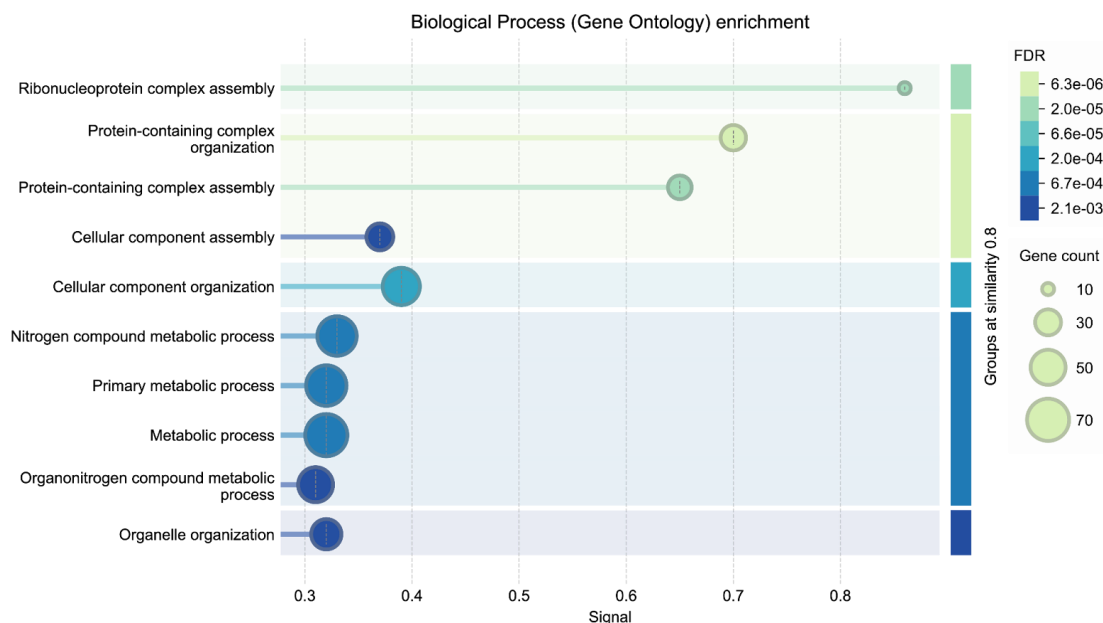
fundo (gradiente verde-azul) corresponde ao valor de significância estatística corrigida (FDR), em que verde indica maior significância.



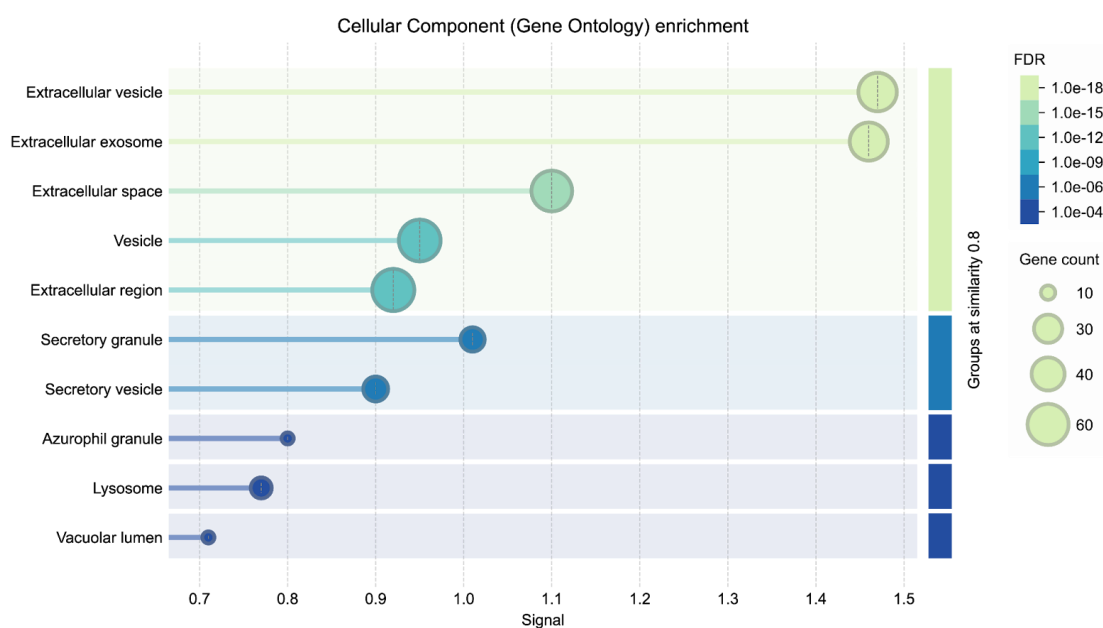
**Figura 16.** Interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente abundantes na amostra G em relação à amostra C. As linhas entre as proteínas correspondem às ligações diretas existentes entre as proteínas, sendo que a espessura da linha entre as proteínas, indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação. Quanto mais espessa a linha, maior é a confiança.



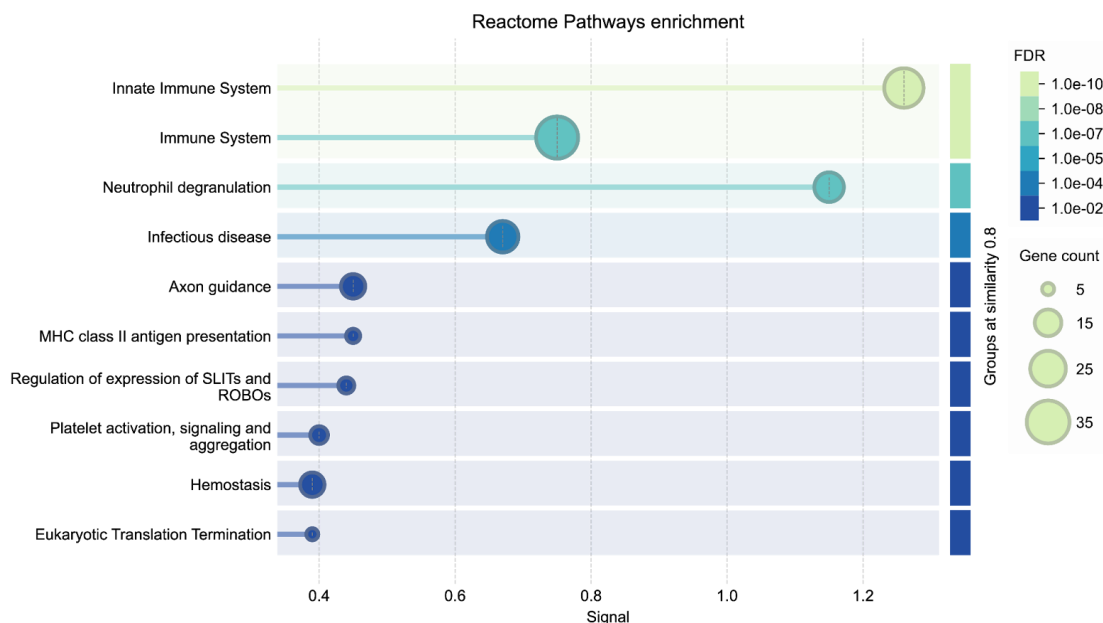
**Figura 17.** Análise de enriquecimento funcional em relação à função molecular das proteínas diferencialmente abundantes entre as amostras G e C obtida pela plataforma STRING DB.



**Figura 18.** Análise de enriquecimento funcional em relação aos processos biológicos das proteínas diferencialmente abundantes entre as amostras G e C obtida pela plataforma STRING DB.



**Figura 19.** Análise de enriquecimento funcional em relação aos componentes celulares/localização celular das proteínas diferencialmente abundantes entre as amostras G e C obtida pela plataforma STRING DB.



**Figura 20.** Análise de enriquecimento funcional em relação às vias de sinalização envolvidas pelas proteínas diferencialmente abundantes entre as amostras G e C obtidas pela plataforma STRING DB (Reactome).

Com o intuito de identificar proteínas moduladas pela GEO com relevância funcional no contexto inflamatório, foi elaborada uma lista das biomoléculas diferencialmente abundantes entre o grupo tratado com G e o grupo C, selecionando aquelas diretamente associadas aos processos de iniciação, amplificação ou resolução da inflamação. Essas proteínas, bem como suas principais funções descritas na literatura, estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Lista das proteínas moduladas pela geoprópolis em monócitos humanos com relevância comprovada nos processos de iniciação, amplificação ou resolução da inflamação, indicando as funções centrais de cada biomolécula no contexto inflamatório.

| Código | Nome da Proteína | Função relacionada ao processo inflamatório                                       |
|--------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| P29466 | Caspase-1        | Processamento de IL-1 $\beta$ e IL-18 via inflamassoma; induz inflamação          |
| P17931 | Galectin-3       | Ativação celular, quimiotaxia, remodelamento de matriz e fibrose                  |
| C9JH19 | Cathepsin D      | Protease lisossomal; degrada matriz e participa na remodelação tecidual           |
| P25774 | Cathepsin S      | Protease ativadora de moléculas inflamatórias e antígeno; remodelamento de matriz |

|            |                                                                  |                                                                     |
|------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| E9PHZ5     | Cathepsin B                                                      | Associada a inflamação, morte celular e ativação do inflamassoma    |
| P12544     | Granzyme A                                                       | Induz inflamação e citotoxicidade independente de apoptose clássica |
| P05120     | Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2/SERPINE2)               | Inibe fibrinólise; ligação inflamação ↔ fibrose; regula reparo      |
| P07602     | Prosaposin                                                       | Envolvido em reparo tecidual e resolução da inflamação              |
| E9PGA6     | Complement C1q TNF-related protein 3                             | Imunomodulador com ação anti-inflamatória                           |
| Q92835     | Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 (SHIP1) | Reduz PI3K; modula negativamente inflamação                         |
| O00560     | Syntenin-1                                                       | Formação de vesículas extracelulares; comunicação inflamatória      |
| Q92973     | Transportin-1                                                    | Transporte nuclear de proteínas regulatórias                        |
| Q8WUW1     | Protein BRICK1                                                   | Reorganização do citoesqueleto; migração celular                    |
| Q9Y6B6     | Rab-2B                                                           | Tráfego vesicular; recrutamento e secreção                          |
| K7ERI8     | Rab-5C                                                           | Endocitose e fagocitose - interface inflamatória                    |
| R4GNE4     | Glutathione peroxidase                                           | Reduz espécies reativas de oxigênio; proteção celular               |
| Q13162     | Peroxiredoxin-4                                                  | Antioxidante; controle de estresse oxidativo                        |
| O95372     | Acyl-protein thioesterase 2                                      | Despalmitoilação; remodela sinalização associada à membrana         |
| A0A6Q8PF87 | Apoptosis inducing factor (mitochondria-associated)              | Morte celular controlada; resolução pós-inflamação                  |
| A0A7I2V3V0 | Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)          | Reprogramação fenotípica; transição para resolução                  |

A investigação proteômica revelou mudanças significativas no perfil de expressão proteica induzidas pelo tratamento com GEO. No total, 127 proteínas apresentaram variação diferencial de abundância em comparação ao controle ( $p \leq 0,05$ ;  $FC \geq 2,0$ ), das quais 20 foram diretamente relacionadas ao processo inflamatório. Essas proteínas englobam marcadores

envolvidos desde a detecção e ativação inicial da resposta imune, passando pela modulação e amplificação do processo inflamatório, até mecanismos associados à citotoxicidade, comunicação intercelular, resolução da inflamação, reparo tecidual e homeostase oxidativa, conforme sintetizado na Tabela 4.

De forma integrada, esses achados sugerem que a GEO exerce modulação distribuída por múltiplos estágios da resposta inflamatória, o que converge com os resultados observados anteriormente para citocinas e marcadores de superfície, reforçando o potencial imunomodulador desse produto apícola.

Além da análise proteômica realizada em monócitos humanos, também foi conduzida a preparação de amostras provenientes de macrófagos derivados da linhagem THP-1 tratados com GEO, com o objetivo de permitir uma comparação direta entre modelos celulares ao nível proteico, o que está sendo realizado e será incluído na publicação dos resultados.

## 5. DISCUSSÃO

A inflamação, apesar de ser um mecanismo essencial de defesa e, quando exacerbada ou mal regulada, contribui para o desenvolvimento e agravamento de diversas doenças crônicas (MEDZHITOV, 2008; FURMAN *et al.*, 2019). Entre os principais mediadores envolvidos nesse processo, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias, os eicosanoides e as EROS, que conjuntamente promovem e perpetuam a resposta inflamatória (CHEN *et al.*, 2017).

O interesse por investigar os efeitos anti-inflamatórios da GEO surgiu inicialmente a partir dos resultados promissores obtidos em nosso grupo de pesquisa com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) durante meu trabalho de mestrado. Nesses experimentos prévios, observamos que concentrações específicas da GEO (25 µg/mL) isoladamente ou em combinação com a DEXA exibiam atividades imunomoduladoras significativas, ao mesmo tempo que mantinham baixa citotoxicidade, sugerindo seu potencial terapêutico em condições inflamatórias (HONORIO *et al.*, 2024). Diante desses resultados, buscamos aprofundar nosso entendimento sobre os mecanismos envolvidos nesses efeitos, expandindo os estudos para um modelo celular mais específico e representativo do microambiente inflamatório: o macrófago, por desempenhar papel central no controle e resolução da resposta inflamatória, sendo capaz de produzir diversos mediadores inflamatórios (YANG *et al.*, 2023; GUAN *et al.*, 2025). Há considerável divergência na literatura quanto aos protocolos para indução de diferenciação celular com PMA, havendo diferentes concentrações

que variam de 5 a 200 ng/mL, e tempos de exposição entre 24 e 72 h (PARK *et al.*, 2007). Assim, nosso primeiro passo experimental foi verificar se o PMA, na concentração escolhida (20 ng/mL), induzia, de fato, a diferenciação celular. Conforme observado em nossos resultados, as análises de CD11b e CD14 não revelaram diferenças antes e após o tratamento. Contudo, tivemos o interesse em realizar análise microscópica das células, verificando que, após tratamento com PMA por 24 h, houve maior aderência das mesmas à microplaca de cultura, alterações no formato celular, aumento do tamanho e espreado celular, com presença de prolongamentos citoplasmáticos, compatíveis com o fenótipo de macrófagos diferenciados. Esses achados estão de acordo com os autores que consideram tais alterações morfológicas como indicadores confiáveis de diferenciação (CHANPUT *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2023). Em seguida, analisamos se as concentrações escolhidas de GEO e DEXA eram seguras para essas células, já que o sucesso das etapas posteriores dependeria da preservação da viabilidade celular.

Para mimetizar uma condição inflamatória mais próxima do contexto fisiopatológico, as células diferenciadas com PMA foram estimuladas com LPS (100 ng/mL) por 2 h antes da adição dos tratamentos com GEO e DEXA. Essa abordagem visou garantir que as células se encontrassem em um estado ativado, semelhante ao observado em processos inflamatórios *in vivo*, possibilitando uma avaliação mais realista da capacidade moduladora dos compostos testados. Após o período inicial de ativação, os tratamentos foram adicionados e as células permaneceram incubadas por mais 18 h com GEO e DEXA, isoladamente ou em associação. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por meio do método colorimétrico de redução do MTT.

Os resultados demonstraram que as concentrações escolhidas da GEO (25 µg/mL e 12,5 µg/mL) não afetaram a viabilidade celular, o que confirmou a segurança dessas concentrações para prosseguir com os experimentos posteriores. Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, que também demonstraram a ausência de citotoxicidade da GEO em células THP-1 (OLIVEIRA *et al.*, 2016), em monócitos humanos e em PBMC (ARAÚJO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019; HONORIO *et al.*, 2024). Além disso, esses estudos demonstraram que o solvente utilizado na preparação do extrato da GEO e na diluição da DEXA (etanol 70%) não exerceu efeito citotóxico significativo sobre as células, reforçando assim a segurança do método.

As concentrações de DEXA (10 e 5 µM) também não induziram ação citotóxica em macrófagos. Esses resultados estão de acordo com achados presentes na literatura, nos quais a DEXA também não apresentou citotoxicidade em diversas outras linhagens celulares, como células progranulocíticas humanas HL60, células-tronco mesenquimais, hepatócitos,

osteoblastos, células CAD (linhagem neuronal) e células A549 (linhagem imortalizada pulmonar), mesmo quando testadas em concentrações mais elevadas (até 100  $\mu\text{M}$ ) (CRABTREE *et al.*, 1979; ZHANG, LIU & LIANG, 2018; HAN *et al.* 2022; NUZZI *et al.*, 2022; SHIMASAKI *et al.* 2024).

Confirmada a ausência de citotoxicidade das concentrações utilizadas de GEO e DEXA, foi possível prosseguir para a avaliação dos marcadores de superfície. A inflamação pode se refletir em alterações fenotípicas das células do sistema imunológico, particularmente dos macrófagos, cuja ativação é marcada pela expressão diferenciada de receptores e moléculas de superfície. Essas alterações indicam mudanças no perfil funcional dos macrófagos, frequentemente associadas à polarização para fenótipos pró-inflamatórios (M1) ou reguladores (M2) (MURRAY & WYNN, 2011; MANTOVANI *et al.*, 2013; ITALIANI & BORASCHI, 2014). Com base nesse contexto, realizamos a análise de marcadores de superfície (TLR2, TLR4, CD80 e CD62L) em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e tratadas com GEO e DEXA, visando compreender se os efeitos observados nos parâmetros funcionais estavam acompanhados por mudanças na ativação fenotípica dessas células.

Os resultados mostraram que TLR2 e CD62L exibiram alterações significativas, enquanto CD80 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (GEO, DEXA ou combinação) em relação ao grupo controle estimulado com LPS, e TLR4 não apresentou expressão detectável durante os experimentos. Esses achados sugerem que parte dos efeitos imunomoduladores detectados posteriormente nos níveis de citocinas e eicosanoides pode estar associada à modulação de TLR2 e CD62L, enquanto CD80 não parece desempenhar papel relevante nesse contexto.

A expressão de TLR2 nos tratamentos com GEO (25  $\mu\text{g/mL}$  e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram valores significativamente maiores do que a combinação, enquanto DEXA 10  $\mu\text{M}$  mostrou valor menor; DEXA 5  $\mu\text{M}$  não diferiu. Isso indica que GEO isolada induz expressão de TLR2, mas a associação GEO + DEXA e a DEXA isolada reduzem essa expressão. Essa redução condiz com a literatura que demonstra que os glicocorticoides diminuem a expressão de TLR2. RICCI *et al.* (2021) demonstraram que o tratamento de neutrófilos de camundongos e humanos com DEXA reduziu a expressão de TLR2, tanto em nível basal quanto após estimulação com GM-CSF, e esse efeito foi acompanhado de redução da atividade fungicida e da fagocitose. Estudos com própolis demonstraram que, em modelo de periodontite apical, o extrato de própolis de Java oriental reduz significativamente

a expressão de TLR2 e NF- $\kappa$ B nos tecidos radiculares (YUANITA et al., 2018). Por outro lado, a própolis vermelha brasileira aumentou a expressão das moléculas coestimuladoras CD80/CD86 (fenótipo M1), mas reduziu a expressão de TIRAP, um adaptador da via TLR2/TLR4 (BUENO-SILVA et al., 2015). Embora a dexametasona tenha apresentado redução mais pronunciada da expressão de TLR2, a GEO isolada também foi capaz de reduzir sua expressão em relação ao LPS, indicando que ambos os tratamentos contribuem para a modulação desse receptor, ainda que com magnitudes distintas.

Em relação ao TLR4, é importante destacar que a ativação de TLRs, especialmente TLR4, é um evento precoce e altamente sensível ao estímulo com LPS, ocorrendo em um curto intervalo de tempo. Assim, a ausência de variação na expressão proteica desses receptores na superfície celular após 18 h de incubação pode refletir um retorno à homeostase de expressão, ou ainda, um mecanismo de modulação pós-transcricional que não se reflete em alterações detectáveis na membrana celular (LU, YEH & OHASHI, 2008; KAWASAKI & KAWAI, 2014). Além disso, a GEO pode estar atuando em alvos intracelulares ou vias de sinalização downstream dos TLRs, como as cascatas de NF- $\kappa$ B e MAPKs, influenciando diretamente a produção de mediadores inflamatórios sem alterar a expressão de receptores de superfície. Essa hipótese está alinhada com estudos anteriores que demonstraram que a atividade de compostos naturais polifenólicos ocorre frequentemente por regulação epigenética e inibição de vias inflamatórias intracelulares, sem interferência direta na expressão de TLRs ou moléculas coestimuladoras (LOCATI et al., 2013; DUTRA et al., 2019).

A expressão de CD62L sob estímulo de LPS aumentou significativamente, enquanto os tratamentos com GEO, DEXA ou a combinação GEO + DEXA reduziram essa expressão para níveis próximos ao controle. Embora CD62L seja tipicamente expresso por monócitos e linfócitos, foi mencionado que sua expressão tende a diminuir durante a diferenciação em macrófagos (PÉDRON et al., 2001; LU et al., 2008). Entretanto, ITO et al. (2021) relataram que colônias derivadas de progenitores mieloides com alta expressão de CD62L se diferenciam terminalmente em macrófagos ou neutrófilos. O aumento observado com LPS, por sua vez, contraria o esperado e pode refletir uma resposta específica do modelo THP-1 na ativação inflamatória. Estudos anteriores mostram que o LPS promove o “shedding” de CD62L por ativação de metaloproteases, mas isso pode variar de acordo com o tipo celular, tempo de exposição e condições experimentais (ERDOES et al., 2013). A redução da expressão de CD62L nos grupos tratados sugere que GEO e DEXA atuaram como

moduladores negativos desse marcador, possivelmente interferindo nos mecanismos de regulação inflamatória, seja por inibição transcricional ou por estabilização da proteína ou bloqueio da indução do LPS.

Por fim, em relação ao CD80, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle estimulado com LPS. O CD62L e o CD80 também não apresentaram diferença entre os tratamentos isolados e a combinação, sugerindo que a ação da GEO e da DEXA, isoladas ou em conjunto, pode não impactar fortemente todos os aspectos do fenótipo de ativação de macrófagos neste modelo experimental.

Considerando que a ativação celular mediada por PRRs culmina na produção e liberação de mediadores solúveis, tornou-se fundamental avaliar se as alterações observadas no fenótipo celular se refletiam em modificações na produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanoides.

As citocinas são glicoproteínas secretadas por diferentes tipos celulares e exercem funções amplas, desde a regulação da proliferação e diferenciação celular até a modulação da resposta imunológica e inflamatória. No contexto inflamatório, sua produção está intimamente associada à geração de EROS, promovendo um ciclo de retroalimentação que intensifica o estresse oxidativo e contribui para a manutenção do processo inflamatório (SCHELLER *et al.*, 2011; BHOL *et al.* 2024).

Diante disso, avaliamos o perfil de produção de diversas citocinas (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-8, IL-18 e IL-33) após o tratamento de macrófagos com GEO e DEXA, isoladamente ou em combinação. A análise foi realizada após o estímulo prévio com LPS, seguido do tratamento por 18 h, permitindo investigar o potencial modulador dessas substâncias sob condição inflamatória.

O TNF é uma das principais citocinas pró-inflamatórias liberadas precocemente por macrófagos ativados, monócitos e linfócitos. Sua ação está diretamente associada à ativação de vias de sinalização intracelular, como NF- $\kappa$ B e MAPK, que induzem a expressão de genes inflamatórios, estimulam a produção de outras citocinas, como IL-1 e IL-6, e aumentam a geração de EROS, além de promover a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, facilitando o recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação (CHEN *et al.*, 2017; FURMAN *et al.*, 2019). Devido ao seu papel na amplificação da resposta inflamatória, o TNF está diretamente associado a doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. A produção excessiva dessa citocina contribui para a inflamação persistente e dano

tecidual, justificando o uso de terapias anti-TNF (como inibidores biológicos) no tratamento dessas condições (ZHANG *et al.*, 2020; GARCÍA- DOMINGUEZ, 2025). Assim, a avaliação dos efeitos da GEO e da DEXA sobre a produção de TNF neste estudo foi fundamental para entender o potencial imunomodulador desses compostos.

No presente estudo, a produção de TNF foi significativamente reduzida em macrófagos tratados com GEO, tanto isoladamente quanto em associação com a DEXA, quando comparadas ao grupo controle tratado apenas com LPS. A DEXA isolada também foi capaz de reduzir a produção de TNF, conforme esperado, já que este fármaco atua diretamente na inibição da transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo o TNF.

Comparando cada tratamento com a combinação, observamos que a GEO 25 µg/mL e GEO 12,5 µg/mL apresentaram níveis de TNF significativamente maiores que a associação, enquanto DEX 10 e 5 µM não apresentaram diferença. Isso sugere que a associação pode representar uma alternativa para reduzir a dose de DEXA, mantendo um efeito anti-inflamatório relevante.

Esses resultados corroboram nossos achados anteriores obtidos com PBMC, nos quais a GEO isoladamente ou em combinação com a DEXA também reduziu significativamente os níveis de TNF (HONORIO *et al.*, 2024). No entanto, estudos anteriores demonstraram que esse efeito pode variar de acordo com o estado de ativação celular. Como exemplo, ARAÚJO *et al.* (2015) e OLIVEIRA *et al.* (2016) observaram aumento da produção de TNF em células não estimuladas, indicando que, sob condições basais, a GEO pode atuar como imunomodulador, promovendo ativação fisiológica. Já OLIVEIRA *et al.* (2019) relataram aumento de TNF quando GEO foi associada à doxorrubicina, sugerindo que o contexto experimental e o ambiente inflamatório prévio influenciam substancialmente a resposta celular. Esses resultados também estão de acordo com outros trabalhos com própolis e seus compostos isolados. GHOLAMI, DINARVAND & HARIRI (2024), por meio de metanálise de ensaios clínicos randomizados, demonstraram que a suplementação com própolis em humanos é eficaz na redução de TNF e outros marcadores inflamatórios, como IL-6 e proteína C reativa.

Considerando a estreita relação entre o TNF e outras citocinas da fase inicial da inflamação, como a IL-1β, prosseguimos com a análise dessa interleucina, que também exerce papel central na amplificação da resposta inflamatória.

A IL-1β é uma citocina pró-inflamatória essencial na defesa do hospedeiro, produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e endoteliais ativadas.

Sua síntese e liberação dependem da ativação do inflamassoma, que converte a forma inativa da molécula em sua forma biologicamente ativa. Atuando de maneira sinérgica com o TNF, a IL-1 $\beta$  induz a expressão de múltiplas citocinas e mediadores inflamatórios, favorecendo a perpetuação do processo inflamatório e contribuindo para o agravamento de doenças inflamatórias crônicas e degenerativas (ZHANG *et al.*, 2007; GUO, GALLAWAY & TING, 2015; SHARMA & KANNEGANTI, 2021).

No presente estudo, observamos que tanto a GEO quanto a DEXA, isoladamente ou em combinação, reduziram significativamente a produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos sob estímulo inflamatório com LPS. Esses achados sugerem que a GEO exerce um efeito imunomodulador relevante sobre a via do inflamassoma, possivelmente inibindo sua ativação e, conseqüentemente, interferindo na maturação e secreção de IL-1 $\beta$ .

A associação da GEO com DEXA, mesmo em concentrações reduzidas, foi suficiente para promover uma diminuição comparável à obtida com a DEXA isoladamente em concentrações mais elevadas.

Já é elucidado que a DEXA exerce forte ação anti-inflamatória sobre macrófagos. JEON *et al.* (2000) demonstraram que DEXA inibe a expressão do gene de IL-1 $\beta$  em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, bloqueando a ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B/Rel e AP-1. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a redução de IL-1 $\beta$  observada com DEXA isolada pode ser alcançada com doses menores quando associada à GEO, reforçando a ideia de que a GEO contribui para manter o efeito inibitório de IL-1 $\beta$  e permitindo pensar em estratégias terapêuticas com menor exposição ao glicocorticoide.

Esses resultados estão em de acordo com achados em estudos anteriores conduzidos por nosso grupo, nos quais a GEO também foi capaz de inibir a produção de IL-1 $\beta$  em PBMC, associada ou não com DEXA, e em células THP-1, associada ou não a um quimioterápico, a doxorrubicina (OLIVEIRA *et al.*, 2016; HONORIO *et al.*, 2024).

HORI e colaboradores (2013) demonstraram que o extrato padronizado de própolis brasileira (EPP-AF) inibe a ativação do inflamassoma NLRP3 em macrófagos murinos, reduzindo drasticamente a secreção de IL-1 $\beta$  após estimulação por LPS e nigericina, provavelmente por interferir na ativação da caspase-1. Esse resultado está de acordo com achados em células dendríticas humanas, nas quais a combinação de um antígeno tumoral com própolis manteve os níveis de IL-1 $\beta$  semelhantes aos de células controle, ao passo que o antígeno isolado aumentava a citocina (SANTIAGO *et al.*, 2023).

A IL-6 é comumente induzida por TNF e IL-1 $\beta$ , e considerando que ambas foram

significativamente moduladas pelos tratamentos com GEO e DEXA neste estudo, foi considerado relevante investigar se a IL-6, que atua como mediadora chave na sustentação da resposta inflamatória, também seria afetada por esses compostos.

A IL-6 é uma citocina com potente ação pró-inflamatória, secretada por diversos tipos celulares, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, hepatócitos e células da glia. Sua produção é estimulada por mediadores como TNF e IL-1 $\beta$ , estando envolvida na indução de proteínas de fase aguda, na diferenciação de linfócitos B e na polarização de linfócitos T para o perfil Th17. Embora apresente efeitos contextualmente anti-inflamatórios, sua superexpressão está fortemente associada à cronicidade de doenças inflamatórias (SCHELLER *et al.*, 2011; KUROWSKA *et al.*, 2020).

Neste estudo, observamos que a produção de IL-6 foi significativamente reduzida nas células THP-1 diferenciadas em macrófagos tratadas com GEO e DEXA, isoladamente ou em combinação, quando comparadas ao grupo tratado apenas com LPS. Essa redução indica que tanto a GEO quanto a DEXA foram capazes de modular negativamente a liberação de IL-6 em um contexto inflamatório. Analisando a comparação entre os tratamentos isolados e a combinação, revelou diferença significativa apenas entre a DEXA 10  $\mu$ M e a combinação, sendo que esta última apresentou níveis menores de IL-6. Já GEO (25 e 12,5  $\mu$ g/mL) e DEXA 5  $\mu$ M não diferiram da associação. Esses achados sugerem que a combinação de GEO com uma concentração reduzida de DEXA potencializa a inibição de IL-6 em relação à concentração mais elevada de DEXA isoladamente, sem modificar de forma relevante os efeitos observados para a GEO isolada.

Estudos anteriores do nosso grupo já haviam demonstrado o potencial da GEO em reduzir os níveis de IL-6 em modelos celulares inflamatórios (OLIVEIRA *et al.*, 2016; HONORIO *et al.*, 2024), o que condiz com os resultados encontrados neste trabalho. No entanto, os achados atuais também apontam para uma complexidade na modulação da IL-6, que parece ser mais responsiva ao combinar a GEO com a DEXA, exigindo abordagens adicionais para compreender plenamente os mecanismos envolvidos.

Estudos com própolis mostram efeitos consistentes sobre a IL-6. ALQARNI *et al.* (2019) avaliaram extratos de própolis em células THP-1 diferenciadas e demonstraram que todos os extratos testados reduziram significativamente a secreção de IL-6 induzida por LPS. O que corrobora com os resultados obtidos por ALANAZI e colaboradores (2020), que relataram que própolis temperada diminuiu substancialmente a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$  em macrófagos derivados de medula óssea estimulados com LPS.

De forma semelhante, CHANG *et al.* (2021) investigaram a ação da DEXA sobre a transcrição de IL-6 em macrófagos RAW 264.7 e observaram que a LPS elevou a atividade do promotor e o mRNA de IL-6, enquanto a DEXA reverteu totalmente essa indução; o tratamento com DEXA isoladamente não alterou os níveis basais de IL-6. Esses autores demonstraram que o efeito inibitório envolve a interação do receptor de glicocorticoide com elementos do promotor de IL-6, em especial os sítios de NF- $\kappa$ B e AP-1.

Diante da inibição observada nas citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6), tornou-se relevante investigar se os tratamentos também modulavam a produção de citocinas com perfil anti-inflamatório, como a IL-10. Essa análise foi essencial para compreender se o efeito da GEO e da DEXA está restrito à supressão da inflamação ou se também envolve a indução ativa de mecanismos regulatórios que contribuem para a resolução do processo inflamatório.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória essencial para a regulação da resposta imunológica e a prevenção de danos teciduais decorrentes da inflamação exacerbada. É produzida principalmente por macrófagos, linfócitos T reguladores e células dendríticas, atuando na inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6, além de reduzir a apresentação de antígenos e a ativação de células T. A IL-10 também é considerada um marcador de resolução inflamatória e sua regulação inadequada está associada tanto à persistência da inflamação quanto à susceptibilidade a infecções (SARAIVA, VIEIRA & O'GARRA, 2020).

No presente estudo, a produção de IL-10 foi significativamente reduzida nos macrófagos tratadas com GEO, DEXA ou com a combinação de ambos, em comparação ao grupo inflamatório tratado apenas com LPS. Embora a IL-10 exerça função anti-inflamatória, sua elevação em contextos agudos pode refletir uma resposta compensatória à intensa liberação de mediadores inflamatórios. Assim, a redução observada pode indicar que os tratamentos promoveram um reequilíbrio da resposta imunitária, tornando possivelmente desnecessária uma expressão exacerbada de IL-10. A análise comparativa revelou que as concentrações de GEO 25  $\mu$ g/mL e GEO 12,5  $\mu$ g/mL mantiveram níveis de IL-10 superiores aos observados para a associação GEO + DEXA, ao passo que os tratamentos com DEXA (10 e 5  $\mu$ M) apresentaram valores semelhantes aos da combinação. Esse resultado demonstra que a GEO, quando utilizada isoladamente, mantém uma produção mais elevada de IL-10, sugerindo sua capacidade de sustentar mecanismos reguladores.

Esse comportamento já foi descrito por IYER & CHENG (2012) e BARRY *et al.* (2016), os quais destacaram que, diante da supressão de citocinas pró-inflamatórias, há

frequentemente uma redução paralela de IL-10 como consequência da menor pressão inflamatória sobre o sistema imunológico. De forma similar, BUENO-SILVA *et al.* (2017) observaram que a própolis vermelha brasileira também reduziu a produção de IL-10 em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS, sugerindo que a ação imunomoduladora da própolis pode não estar associada necessariamente à indução de vias anti-inflamatórias clássicas, mas sim à restauração da homeostase do microambiente inflamatório.

Além disso, estudos como os de BACHIEGA *et al.* (2012) e BÚFALO *et al.* (2009) mostram que a resposta da IL-10 à própolis varia conforme a composição química do extrato, o modelo celular e o tempo de incubação, o que reforça a necessidade de análises contextuais e específicas para interpretar os efeitos observados.

As citocinas IL-8, IL-18 e IL-33 foram incluídas nos ensaios de quantificação por ELISA com o objetivo de ampliar a compreensão do perfil inflamatório modulado pelos tratamentos. No entanto, não foi possível detectar a produção dessas citocinas nas células THP-1 diferenciadas em macrófagos sob estímulo com LPS, em nenhuma das condições avaliadas. A ausência de detecção pode ser atribuída a diferentes fatores técnicos e biológicos, não permitindo obter conclusões consistentes quanto à sua produção. Do ponto de vista técnico, a sensibilidade dos kits ELISA utilizados pode não ter sido suficiente para quantificar níveis muito baixos dessas citocinas. A estabilidade das proteínas alvo no sobrenadante e a cinética de secreção específica de cada citocina também podem ter influenciado na ausência de sinal detectável, visto que algumas citocinas, como a IL-33, podem ser expressas de forma transiente ou intracelularmente, sendo liberadas apenas em situações de dano celular ou necrose (CAYROL & GIRONES, 2018; SCHMITT *et al.*, 2024). Biologicamente, é possível que as células THP-1, mesmo diferenciadas em macrófagos, não representem a principal fonte dessas citocinas nesse tipo de estímulo, ou que o tempo de incubação e a intensidade do estímulo com LPS não tenham sido suficientes para induzir sua produção em níveis detectáveis. Por exemplo, a IL-8 está mais frequentemente associada à ativação de neutrófilos e células epiteliais, enquanto a IL-18 e a IL-33 geralmente requerem ativação intensa do inflamassoma ou presença de sinais de alarme (alarminas) celulares (DINARELLO *et al.*, 2013; WILLIAMS *et al.*, 2019). Portanto, a ausência de detecção não descarta a relevância dessas citocinas, mas reforça a importância de considerar o tipo celular, o tempo de exposição e a natureza do estímulo ao interpretar dados de secreção em modelos *in vitro*.

Outro grupo de mediadores inflamatórios de grande relevância são os eicosanoides,

como a PGE2 e o LTB4, que são derivados do ácido araquidônico e desempenham papéis centrais na mediação e amplificação da inflamação. A PGE2 é amplamente reconhecida por suas funções pró-inflamatórias, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e sensibilização de nociceptores, estando frequentemente associada à dor, febre e inflamação crônica. Já o LTB4 é um potente quimiotático, responsável pelo recrutamento e ativação de neutrófilos no sítio inflamatório, além de promover a produção de citocinas e EROS (ZOCCAL *et al.*, 2016; BONYEK-SILVA *et al.*, 2020).

Neste estudo, observamos que o tratamento com GEO e DEXA, tanto isoladamente quanto em combinação, reduziu significativa a produção de PGE2 e LTB4 pelos macrófagos estimulados com LPS. Esses resultados indicam que ambos os compostos foram eficazes em modular negativamente a produção de mediadores lipídicos inflamatórios, o que reforça seu potencial anti-inflamatório. A combinação GEO + DEX reduziu PGE2 de forma significativa em relação a GEO 25 µg/mL, enquanto GEO 12,5 µg/mL e as doses de DEX isoladas não diferiram da associação. Nenhuma das comparações apresentou diferença significativa, indicando que os tratamentos isolados e a combinação reduzem sutilmente, mas não alteraram a liberação de LTB4.

A inibição da PGE2 observada com a GEO pode estar relacionada à supressão da atividade da enzima COX-2, geralmente induzida por estímulos inflamatórios como o LPS (JIN *et al.*, 2023). Esse efeito é apoiado por estudos como o de LEE *et al.* (2013), que demonstraram que a inibição da sinalização da PGE2 via receptores EP2/EP4 resultou em menor adesão celular em modelos de endometriose, e por dados mais recentes que mostram que a redução da PGE2 facilita a resolução da inflamação intestinal em modelos murinos, com redução da infiltração leucocitária e expressão de citocinas (PUNYAWATTHANANUKOO *et al.*, 2024).

Já a redução de LTB4 pode indicar uma possível interferência na via da 5-LOX (TEDER *et al.*, 2023), como sugerem os dados de LIU *et al.* (2023), que revelaram que o eixo LTB4/LTB4R1 está associado à amplificação de respostas inflamatórias em diferentes contextos celulares, incluindo hepatócitos, onde sua inibição reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de vias inflamatórias associadas ao metabolismo lipídico. Além disso, SEREZANI *et al.* (2012) relataram que o LTB4 pode amplificar a geração de espécies reativas e ativar a NADPH oxidase em macrófagos, exacerbando o dano tecidual. A modulação desses mediadores pela GEO pode, portanto, contribuir para uma resposta inflamatória menos intensa e potencialmente menos lesiva.

A DEXA, por sua vez, atua inibindo a expressão de fosfolipase A2, enzima responsável por liberar o ácido araquidônico da membrana celular, o que contribui para a redução geral dos eicosanoides (ZHANG *et al.*, 2024). A combinação de GEO com DEXA resultou em níveis reduzidos de PGE2 e LTB4 comparáveis aos obtidos com a DEXA isoladamente, sugerindo que a associação não comprometeu a eficácia da DEXA e pode, inclusive, contribuir para o aumento da ação anti-inflamatória de forma mais segura.

Após a avaliação dos mediadores inflamatórios, buscou-se investigar se as alterações observadas na produção de citocinas e eicosanoides se refletiriam em funções efetoras clássicas dos macrófagos. Para isso, foram realizados ensaios de atividade bactericida frente a *Staphylococcus aureus* e de produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), parâmetro este diretamente relacionado à capacidade microbicida dessas células. No entanto, em ambas as análises foi observada elevada variabilidade entre os resultados, sem a obtenção de um padrão consistente que permitisse uma interpretação estatística confiável dos dados. Dessa forma, não foi possível estabelecer conclusões sobre os efeitos da GEO e da DEXA, isoladas ou em associação, sobre essas funções celulares.

Considerando essas limitações, optou-se por empregar uma abordagem complementar e mais abrangente, a análise proteômica, com o objetivo de investigar alterações moleculares induzidas pela GEO em monócitos humanos. Essa estratégia permitiu uma avaliação integrada do perfil proteico celular, contribuindo para a compreensão dos possíveis mecanismos envolvidos na modulação da resposta inflamatória observada nos ensaios anteriores.

A escolha de discutir inicialmente os achados obtidos em monócitos humanos se justifica pelo fato de essas células representarem o estágio precursor natural dos macrófagos e desempenharem papel central na detecção inicial de estímulos inflamatórios, ativação de vias de sinalização e produção de mediadores inflamatórios. Diferentemente das linhagens celulares imortalizadas, os monócitos primários preservam características genéticas, epigenéticas e funcionais mais próximas da resposta observada *in vivo*, o que confere relevância biológica aos perfis proteicos identificados (TEDESCO *et al.*, 2018; YASIN *et al.*, 2022; NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Além disso, a diferenciação *in vitro* de células THP-1 em macrófagos, geralmente induzida por agentes como o PMA, pode resultar em alterações artificiais no estado de ativação celular, afetando vias de sinalização, metabolismo e expressão proteica basal. Assim, a análise proteômica em monócitos humanos permitiu a identificação de proteínas

moduladas pela GEO em um contexto menos influenciado por estímulos de diferenciação forçada, oferecendo uma base sólida para a interpretação dos efeitos imunomoduladores observados ao longo do trabalho. A futura incorporação dos dados proteômicos de macrófagos THP-1 deverá contribuir para aprofundar a compreensão comparativa entre os modelos e fortalecer a interpretação dos mecanismos de ação da GEO.

A análise proteômica realizada em monócitos humanos permitiu ampliar a compreensão dos efeitos imunomoduladores da GEO em um nível molecular mais integrado, complementando os resultados funcionais e fenotípicos observados ao longo deste trabalho. Diferentemente das análises pontuais de citocinas, eicosanoides ou marcadores de superfície, a proteômica possibilitou identificar alterações distribuídas em múltiplas etapas da resposta inflamatória, incluindo ativação inicial, amplificação do processo inflamatório, comunicação intercelular, mecanismos efetores e vias associadas à resolução e ao reparo tecidual.

Entre as proteínas diferencialmente moduladas pela GEO, destaca-se a presença da caspase-1, uma enzima central na ativação do inflamassoma e no processamento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. Esse achado se conecta diretamente com os resultados obtidos nos ensaios de citocinas, nos quais foi observada redução significativa da produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos estimulados com LPS e tratados com GEO. A modulação da caspase-1 sugere que a GEO pode atuar interferindo em eventos posteriores ao reconhecimento inicial do estímulo inflamatório, limitando a ativação do inflamassoma e, consequentemente, atenuando a amplificação da resposta inflamatórias. Estudos anteriores já demonstraram que produtos naturais ricos em compostos fenólicos são capazes de modular a ativação do inflamassoma NLRP3 em células da imunidade inata, reforçando a plausibilidade desse mecanismo (HORI et al., 2013; SHARMA & KANNEGANTI, 2021).

Outro grupo de proteínas relevantes identificado na análise proteômica inclui as catepsinas B, D e S, enzimas lisossomais amplamente envolvidas na degradação da matriz extracelular, no processamento antigênico e no remodelamento tecidual. Essas proteases desempenham papel importante tanto na progressão quanto na modulação da resposta inflamatória, uma vez que participam da ativação de células imunes e da reorganização do microambiente inflamatório (CONUS et al., 2010; TURK et al., 2012). Além disso, estudos demonstram que alterações na permeabilidade lisossomal, com liberação de catepsinas para o citosol, podem atuar como sinal secundário para a ativação do inflamassoma, influenciando a ativação de caspases inflamatórias e a maturação de IL-1 $\beta$  (HORNUNG et al., 2008; AMARAL et al., 2018). A modulação dessas proteínas sugere que a GEO pode interferir em eventos celulares que sustentam a inflamação, indo além da simples supressão

de mediadores solúveis.

A presença da galectina-3 entre as proteínas moduladas também merece destaque. Essa lectina  $\beta$ -galactosídeo-ligante está associada a processos de ativação celular, quimiotaxia, fibrose e inflamação crônica, sendo frequentemente descrita como um marcador de inflamação persistente e remodelamento tecidual patológico (LIU & RABINOVICH, 2005; HENDERSON & SETHI, 2009). Por outro lado, em contextos controlados, a galectina-3 também pode participar de processos de reparo tecidual e resolução inflamatória, dependendo do microambiente e do tipo celular envolvido (MCLEOD et al., 2018). Assim, a modulação dessa proteína pela GEO sugere um possível papel regulador na transição entre inflamação ativa e resolução, o que está em consonância com os resultados observados nos ensaios de citocinas, nos quais houve redução de mediadores pró-inflamatórios sem indução exacerbada de citocinas regulatórias.

Outro achado relevante foi a identificação de proteínas associadas à resolução da inflamação e ao reparo tecidual, como a prosaposina e o PAI-2 (SERPINB2). A prosaposina é descrita como uma proteína multifuncional envolvida em processos de sobrevivência celular, regeneração tecidual e resposta ao estresse, além de atuar na manutenção da integridade celular em ambientes inflamatórios (HIRAIWA et al., 1997; SCHRÖDER et al., 2019). O PAI-2, por sua vez, está relacionado à regulação da fibrinólise, organização da matriz extracelular e controle da inflamação crônica, sendo frequentemente associado à modulação da migração celular e à prevenção de dano tecidual excessivo (MEDCALF, 2007). A modulação dessas proteínas sugere que a GEO pode favorecer um ambiente menos propenso à progressão da inflamação para estados crônicos e fibrosantes, contribuindo para o restabelecimento da homeostase tecidual.

A análise proteômica também revelou alterações em proteínas relacionadas à comunicação intercelular e ao tráfego vesicular, como sintenina-1, transportina-1 e proteínas da família Rab (Rab-2B e Rab-5C). Essas proteínas desempenham papéis centrais no transporte intracelular, na formação de vesículas e na liberação de mediadores por vias não convencionais, incluindo vesículas extracelulares, que têm sido reconhecidas como importantes moduladoras da resposta inflamatória (HOSHINO et al., 2015; STENMARK, 2009). A modulação dessas proteínas sugere que a GEO pode interferir na forma como os monócitos se comunicam com outras células do sistema imune, influenciando a propagação e a amplificação do sinal inflamatório no microambiente tecidual.

Além disso, foram identificadas proteínas associadas à homeostase redox e ao controle do estresse oxidativo, como a glutathione peroxidase e a peroxirredoxina-4. Essas

enzimas antioxidantes desempenham papel essencial na neutralização de EROS e na proteção celular contra danos oxidativos induzidos pela inflamação (HAMPTON & O'CONNOR, 2016). Esses achados são particularmente relevantes quando considerados em conjunto com os resultados funcionais relacionados à produção de EROS, ainda que os ensaios de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não tenham permitido conclusões estatísticas consistentes. A modulação dessas enzimas sugere que a GEO pode contribuir para limitar o dano oxidativo associado à inflamação, mesmo quando alterações diretas na produção de EROS não são facilmente detectáveis em ensaios pontuais.

Quando comparados a estudos prévios realizados em macrófagos derivados da linhagem THP-1, os achados da proteômica em monócitos humanos apontam para uma convergência de mecanismos, especialmente no que se refere à modulação de vias inflamatórias centrais, como inflamassoma, citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos. Estudos proteômicos conduzidos com amostras de própolis verde e vermelha em diferentes modelos celulares também demonstraram alterações em proteínas relacionadas à inflamação, estresse oxidativo, metabolismo energético e remodelamento tecidual, reforçando a atuação ampla e integrada dos produtos apícolas e meliponícolas sobre a resposta inflamatória (TEDESCO et al., 2014; YASIN et al., 2022; NASCIMENTO et al., 2022). No entanto, a análise em monócitos humanos permitiu observar esses efeitos em um contexto menos influenciado por estímulos artificiais de diferenciação, como o PMA, oferecendo uma visão mais próxima da resposta inflamatória inata em condições fisiológicas.

De forma geral, os dados proteômicos obtidos neste trabalho reforçam os achados funcionais e fenotípicos observados ao longo da tese, indicando que a GEO exerce um efeito imunomodulador distribuído em múltiplos níveis da resposta inflamatória. Em monócitos humanos, esse efeito parece envolver não apenas a redução de mediadores pró-inflamatórios, mas também a modulação de proteínas associadas à amplificação do processo inflamatório, à comunicação intercelular, à resolução e à proteção contra danos oxidativos.

Nos ensaios realizados em macrófagos, a associação da GEO com a DEXA manteve a eficácia anti-inflamatória observada com o glicocorticoide isolado para a maioria dos parâmetros avaliados, e mostrou efeito superior especificamente na modulação da IL-6. Esses achados sugerem que a GEO atua predominantemente como um modulador direto da inflamação, podendo exercer efeito adjuvante pontual sobre a ação da DEXA, sem comprometer os mecanismos essenciais da imunidade inata, particularmente relacionados a macrófagos.

Apesar dos efeitos anti-inflamatórios consistentes observados ao longo deste estudo, é importante destacar que, devido à natureza complexa da GEO, não é possível atribuir os efeitos biológicos observados a um único composto químico específico. Embora a composição da GEO utilizada tenha sido previamente caracterizada, revelando a presença de triterpenos, ácidos fenólicos, flavonoides e outros metabólitos bioativos, a atividade farmacológica da amostra provavelmente resulta do sinergismo entre esses diferentes constituintes, e não da ação isolada de um único princípio ativo.

Esse comportamento é característico de produtos naturais complexos, nos quais interações químicas entre compostos podem potencializar efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e imunomoduladores, frequentemente de forma mais eficaz do que substâncias purificadas individualmente. Assim, os efeitos observados sobre citocinas, eicosanoides, marcadores de superfície e proteínas inflamatórias refletem a ação integrada do fitocomplexo presente na GEO, o que também contribui para seu perfil de baixa citotoxicidade e ampla modulação imunológica/inflamatória.

## 6. CONCLUSÃO

A GEO produzida por *Melipona fasciculata* Smith apresentou efeito anti-inflamatório significativo, sem induzir toxicidade em macrófagos. Tanto isolada quanto associada à DEXA, foi capaz de reduzir a expressão de marcadores de superfície e a produção de citocinas e eicosanoides relacionados ao processo inflamatório. A associação, mesmo com doses reduzidas de DEXA, manteve eficácia semelhante à observada com o fármaco isolado, sugerindo que a GEO pode atuar como adjuvante terapêutico, permitindo a manutenção da eficácia da DEXA em concentrações reduzidas, e apresenta potencial para minimizar efeitos colaterais. Além disso, a análise proteômica em monócitos humanos indicou que a GEO modula proteínas envolvidas na ativação, amplificação e resolução da inflamação, bem como no controle do estresse oxidativo. Em conjunto, esses achados demonstram que a GEO atua como um modulador da resposta inflamatória, com potencial uso isolado ou como adjuvante terapêutico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*, v. 537, p. 347-355, 2016.
- 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. 7286-7292, 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, p. 783-801, 2006.
- ALANAZI, S.; ALENZI, N.; FEARNLEY, J.; HARNETT, W.; WATSON, D. G. Temperate propolis has anti-inflammatory effects and is a potent inhibitor of nitric oxide formation in macrophages. *Metabolites*, v. 10, p. 413, 2020.
- ALQARNI, A. M.; NIWASABUTRA, K.; SAHLAN, M.; FEARNLEY, H.; FEARNLEY, J.; FERRO, V. A.; WATSON, D. G. Propolis exerts an anti-inflammatory effect on PMA- differentiated THP-1 cells via inhibition of purine nucleoside phosphorylase. *Metabolites*, v. 9, p. 75, 2019.
- AMARAL, E. P.; RITEAU, N.; MOAYERI, M.; MAIER, N.; MAYER-BARBER, K. D.; PEREIRA, R. M.; LAGE, S. L.; KUBLER, A.; BISHAI, W. R.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.; SHER, A.; ANDRADE, B. B. Lysosomal cathepsin release is required for NLRP3-inflammasome activation by *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 9, art. 1427, 2018.
- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Anti-inflamatórios hormonais: glicocorticóides. *Einstein*, v. 6, p. S159-S165, 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, São Luís, 2009.
- ARAÚJO, M. J. A. M.; 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, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 669-692, 2009.
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*, v. 21, p. 1-10, 2016.
- BACHIEGA, T. F.; ORSATTI, C. L.; PAGLIARONE, A. C.; SFORCIN, J. M. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. *Phytotherapy Research*, v. 26, p. 1308-1313, 2012.

- BANKOVA, V.; BERTELLI, D.; BORBA, R.; CONTI, B. J.; CUNHA, I. B. S.; DANERT, C.; EBERLIN, M. N.; SFORCIN, J. M. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, v. 58, p. 1-49, 2019.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian geopropolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 53, p. 402-406, 1998.
- BANKOVA, V.; POPOV, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Pharmacognosy Reviews*, v. 1, p. 88-92, 2007.
- BARRY, J.; SHAKIBAKHO, S.; DURRER, C.; KIRCHNER, T.; HEUSCHMANN, P.; HÖLSCHER, M. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Scientific Reports*, v. 6, p. 21244, 2016.
- BASIL, M. C.; LEVY, B. D. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, p. 51-67, 2016.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, v. 87, p. 245-313, 2007.
- 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. 2703-2712, 2008.
- BHOL, N. K.; BHANJADEO, M. M.; SINGH, A. K.; DASH, U. C.; OJHA, R. R.; MAJHI, S.; NAYAK, B.; MOHANTY, P. The interplay between cytokines, inflammation, and antioxidants: mechanistic insights and therapeutic potentials of various antioxidants and anti-cytokine compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 178, p. 117177, 2024.
- BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.P.; SCHELLER, S.; KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 25-30, 2004.
- BONYEK-SILVA, I.; NUNES, S.; SANTOS, R. L.; LIMA, F. R.; LAGO, A.; SILVA, J.; CARVALHO, L. P.; ARRUDA, S. M.; SEREZANI, H. C.; CARVALHO, E. M.; BRODSKYN, C. I.; TAVARES, N. M. Unbalanced production of LTB4/PGE2 driven by diabetes increases susceptibility to cutaneous leishmaniasis. *Emerging Microbes & Infections*, v. 9, p. 1275-1286, 2020.
- BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, 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. 100-107, 2017.
- BÚFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M.; SFORCIN, J. M. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 6, p. 483-487, 2009.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, p. 347-363, 1998.
- CARVALHO, P. C.; LIMA, D. B.; LEPREVOST, F. V.; SANTOS, M. D.; FISCHER, J. S.; AQUINO, P. F.; BRIGGS, S. D.; BARBOSA, V. C. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nature Protocols*, v. 11, p. 102-117, 2016.
- CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): a nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunological Reviews*, v. 281, p. 154-168, 2018.
- CHANG, W. T.; HONG, M. Y.; CHEN, C. L.; HWANG, C. Y.; TSAI, C. C.; CHUANG, C. C. Mutant glucocorticoid receptor binding elements on the interleukin-6 promoter regulate dexamethasone effects. *BMC Immunology*, v. 22, p. 24, 2021.
- CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHES, H. J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, v. 23, p. 37-45,

- 2014.
- CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, v. 9, p. 7204-7218, 2017.
- CHEN, S.; SAEED, A.; LIU, Q.; JIANG, Q.; XU, H.; XIAO, G. G.; LU, L.; LI, Y. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, p. 207, 2023.
- CONUS, S. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Medical Weekly*, v. 140, p. w13156, 2010.
- COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 335, p. 2-13, 2011.
- CRABTREE, G. R.; GILLIS, S.; SMITH, K. A.; MUNCK, A. Glucocorticoids and immune responses. *Arthritis & Rheumatology*, v. 22, p. 1246-1256, 1979.
- CUNHA, M. G.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; RANSOM, T.; BEUTLER, J. A. Antiproliferative constituents of geopropolis from the bee *Melipona scutellaris*. *Planta Medica*, v. 82, p. 190-194, 2015.
- DINARELLO, C. A.; NOVICK, D.; KIM, S.; KAPLANSKI, G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in Immunology*, v. 4, p. 289, 2013.
- 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.
- DUAILIBE, 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. 420-423, 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. 557-562, 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. 2549-2557, 2014.
- ERDOES, G.; BALMER, M. L.; SLACK, E.; KOCSIS, I.; LEHMANN, L. E.; EBERLE, B.; STUBER, F.; BOOK, M. CD62L (L-Selectin) shedding in monocytes/granulocytes: perioperative immune assessment. *PLOS One*, v. 8, p. 12, 2013.
- FERREIRA, B. L.; GONZAGA, L.V.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; MALTEZ, H. F.; RESSUREIÇÃO, C.; COSTA, A. C. O. Southern-Brazilian geopropolis: a potential source of polyphenolic compounds and assessment of mineral composition. *Food Research International*, v. 126, p. 108683, 2019.
- 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. 1218-1225, 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.; 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. 709-715, 2012.
- 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. 532-535, 2008.
- FURMAN, D.; CAMPISI, J.; VERDIN, E.; CARRERA-BASTOS, P.; TARG, S.; FRANCESCHI, C.; FERRUCCI, L.; GILROY, D. W.; FASANO, A.; MILLER, G. W.; MILLER, A. H.; MANTOVANI, A.; WEYAND, C. M.; BARIC, R.; GORONZY, J. J.; RANDO, T. A.; EFFROS, R. B.; LUCIA, A.; KLEINSTREUER, N.; SLAVICH, G. M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine*, v. 25, p. 1822-1832, 2019.
- GARCÍA-DOMÍNGUEZ, M. The role of TNF- $\alpha$  in neuropathic pain: an immunotherapeutic perspective. *Life*, v. 15, p. 785, 2025.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, p. 59-84, 1979.
- GHOLAMI, A.; DINARVAND, N.; HARIRI, M. Propolis supplementation can reduce serum level of interleukin-6, C-reactive protein, and tumor necrosis factor- $\alpha$ : an updated systematic review and dose-response meta-analysis on randomized clinical trials. *Journal of Health, Population and Nutrition*, v. 43, p. 119, 2024.
- GOMES, V. A. Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da própolis de *Melipona compressipis fasciculata* (tiúba). Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA, São Luís, 2005.
- GUAN, X.; LI, C.; WANG, X.; YANG, L. Engineered M2 macrophage-derived exosomes: mechanisms and therapeutic potential in inflammation regulation and regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, v. 203, p. 10, 2025.
- GUO, H.; CALLAWAY, J.B.; TING, J.P.Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*, v. 21, p. 677-687, 2015.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Textbook of medical physiology. 11. ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006.
- HAMPTON, M. B.; O'CONNOR, K. M. Peroxiredoxins and the regulation of cell death. *Molecules and Cells*, v. 39, n. 1, p. 72–76, 2016.
- HAN, N. R.; KO, S. G.; PARK, H. J.; MOON, P. D. Dexamethasone attenuates oncostatin M production via suppressing PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling in neutrophil-like differentiated HL-60 cells. *Molecules*, v. 27, p. 129, 2022.
- HENDERSON, N. C.; SETHI, T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunology Reviews*, v. 230, p. 160-171, 2009.
- HIRAIWA, M.; TAYLOR, E.M.; CAMPANA, W.M.; DARIN, S.J.; O'BRIEN, J.S. Prosaposin receptor: evidence for a G-protein-associated receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 240, p. 415-418, 1997.
- HODGENS, A.; SHARMAN, T. Corticosteroids. *StatPearls*, v. 2025, p. 1-6, 2025.
- HONORIO, M. da S.; SARTORI, A. A.; RIPARI, N.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Anti-inflammatory action of geopropolis produced by stingless bees on human peripheral blood mononuclear cells. *Human Immunology*, v. 85, n. 4, p. 110825, 2024.
- HORI, J. I.; ZAMBONI, D. S.; CARRÃO, D. B.; GOLDMAN, G. H.; BERRETTA, A. A. The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013.
- HORNUNG, V.; BAUERNFEIND, F.; HALLE, A.; SAMSTAD, E. O.; KONO, H.; ROCK, K. L.; FITZGERALD, K. A.; LATZ, E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, v. 9, n. 8, p. 847-856, 2008.

- HOSHINO, A.; COSTA-SILVA, B.; SHEN, T. L.; RODRIGUES, G.; HASHIMOTO, A.; TESIC MARK, M. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, v. 527, p. 329–335, 2015.
- ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 514, 2014.
- ITO, Y.; NAKAHARA, F.; KAGOYA, Y.; KUROKAWA, M. CD62L expression level determines the cell fate of myeloid progenitors. *Stem Cell Reports*, v. 16, p. 2871–2886, 2021.
- IYER, S. S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, v. 32, p. 23-63, 2012.
- JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, v. 20, p. 197-216, 2002.
- JEON, Y. J.; HAN, S. H.; LEE, Y. W.; LEE, M.; YANG, K. H.; KIM, H. M. Dexamethasone inhibits IL-1 beta gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF-kappa B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacology*, v. 48, p. 173-183, 2000.
- JIN, K.; QIAN, C.; LIN, J.; LIU, B. Cyclooxygenase-2-Prostaglandin E2 pathway: a key player in tumor-associated immune cells. *Frontiers in Oncology*, v. 13, p. 1099811, 2023.
- KAVAL, M.E.; CAKIR, B.; POLATLI, E.; RENÇBER, S.; KARAVANA, S.Y.; NALBANTSOY, A.; BALCI, T.; GÜNGÖR, T.; KIVÇAK, B. IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  expression levels of macrophage cells induced by benzydamine hydrochloride, benzydamine hydrochloride with chitosan, calcium hydroxide and chlorhexidine medicaments: an ELISA study. *Dental Materials Journal*, v. 41, p. 545-551, 2022.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity. *Nature Immunology*, v. 11, p. 373-384, 2010.
- KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 461, 2014.
- KERN, J.A.; LAMB, R.J.; REED, J.C.; DANIELE, R.P.; NOWELL, P.C. Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes: posttranscriptional mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 81, p. 237-244, 1988.
- 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.; STRÄßBURGER, M.; TROISI, F.; PROSCHAK, E.; BRÄSE, S.; HERKER, E.; WERZ, O. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* abrogates leukotriene B4 formation through inhibition of leukotriene A4 hydrolase. *Cell Chemical Biology*, v. 26, p. 524-534, 2019.
- KUROWSKA, A.; BODYS-CUPAK, I.; STASZKIEWICZ, M.; SZKLARCZYK, J.; ZALEWSKA-PUCHAŁA, J.; KLIŚ-KALINOWSKA, A.; MAZUR, 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.; VIEIRA, B.A.; VERMILHO, A.B.; TELES, R.P.; MARINS, M.L.; NUNES, A.P.F. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: Promising sources of biologically active compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 29, p. 389-399, 2019.
- 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, H.; MENG, Y.; HE, S.; TAN, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, L. Macrophages, chronic inflammation, and insulin resistance. *Cells*, v. 11, p. 3001, 2022.

- 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, F.-T.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, p. 29-41, 2005.
- LIU, X.; WANG, K.; WANG, L.; KONG, L.; HOU, S.; WAN, Y.; MA, J.; XIAO, Y.; ZHANG, Y.; WANG, J.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; LI, X.; ZHANG, Y.; YANG, J.; WANG, X.; LIU, J. Hepatocyte leukotriene B4 receptor 1 promotes NAFLD development in obesity. *Hepatology*, v. 78, p. 562-577, 2023.
- LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Advances in Immunology*, v. 120, p. 163-184, 2013.
- LONGUI, C.A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. *Jornal de Pediatria*, v. 83, p. 163-171, 2007.
- LORSCHERIDER, M.; TSAPIS, N.; UR-REHMAN, M.; GAUDIN, F.; STOLFA, I.; ABREU, S.; MURA, S.; CHAMINADE, P.; ESPELI, M.; FATTAL, E. Dexamethasone palmitate nanoparticles: An efficient treatment for rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*, v. 301, p. 130-141, 2019.
- LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, v. 42, p. 145-151, 2008.
- MACEDO, J.M.S.; OLIVEIRA, I.R. Corticoesteróides. *Farmacologia*, v. 4, p. 760-775, 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. 451-457, 2016.
- MAMUN, A.A.; SHAO, C.; GENG, P.; WANG, S.; XIAO, J. Polyphenols targeting NF- $\kappa$ B pathway in neurological disorders: what we know so far? *International Journal of Biological Sciences*, v. 20, p. 1332-1355, 2024.
- MANTOVANI, A.; BISWAS, S.K.; GALDIERO, M.R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of Pathology*, v. 229, p. 176-185, 2013.
- MCLEOD, K.; WALKER, J.T.; HAMILTON, D.W. Galectin-3 regulation of wound healing and fibrotic processes: insights for chronic skin wound therapeutics. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 12, p. 281-287, 2018.
- MEDCALF, R. L.; STASIUK, R.; DAVIES, M. J. The serpin PAI-2: structure, function and role in disease. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, p. 285-288, 2007.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto de Biologia*, v. 72, p. 405-411, 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. 1097-1103, 2007.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 958-969, 2008.
- 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 Brasiliense*'s. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 331-

- 334, 2002.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, p. 723-737, 2011.
- NASCIMENTO, D. C.; VIEIRA, L. V.; OLIVEIRA, S. C.; SILVA, T. A.; GARCIA, M. A.; FERREIRA, B. R. Comparative analysis of macrophage responses derived from THP-1 cells and primary human monocytes. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 9677084, 2022.
- NUZZI, R.; ROSSI, A.; NUZZI, A. Intravitreal dexamethasone: variation of surgical technique and prevention of ocular complications with ASOCT follow-up. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v. 260, p. 2819-2828, 2022.
- OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. *Current Biology*, v. 22, p. R733-R740, 2012.
- 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. 1551-1558, 2016.
- OLIVEIRA, L.P.G.; CONTE, F.L.; OLIVEIRA CARDOSO, E.; CONTI, B.J.; SANTIAGO, K.B.; DE ASSIS GOLIM, M.; CRUZ, M.T.; SFORCIN, J.M. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. *Life Sciences*, v. 217, p. 81-90, 2019.
- 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. 205-219, 2000.
- ORSOLIC, N.; BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 59, p. 561-570, 2005.
- PAHWA, R.; GOYAL, A.; JIALAL, I. Chronic inflammation. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.
- PAIVA-OLIVEIRA, E.L.; SILVA, A.C.; SILVA, R.M.; SEVENINI, L.A.; MELO, H.A.; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUIRICO-SANTOS, T. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 11, p. 96-102, 2012.
- PANIGRAHY, D.; GILLIGAN, M.M.; SERHAN, C.N.; KASHFI, K. Resolution of inflammation: an organizing principle in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 227, p. 107879, 2021.
- PARK, E.K.; PARK, E.Y.; SHIN, Y.W. et al. Optimized THP-1 differentiation for phenotypic and functional macrophage studies. *Inflammation Research*, v. 56, p. 45-50, 2007.
- PÉDRON, T; GIRARD, R; CHABY, R. Down-modulation of L-selectin by lipopolysaccharide is not required for lipopolysaccharide-induced expression of CD14 in mouse bone marrow granulocytes. *Infection and immunity*, v. 69, p. 4287-4294, 2001.
- 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.
- PINHO-RIBEIRO, F.A.; VERRI, W.A. Jr.; CHIU, I.M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology*, v. 38, p. 5-19, 2017.
- PUNYAWATTHANANUKOOL, S.; MATSUURA, R.; WONGCHANG, T.; KATSURADA, N.; TSURUYAMA, T.; TAJIMA, M.; NAKAGAWA, H.;

- NAKAMURA, K.; YAMAMOTO, N.; OKUMURA, Y.; FUKUDA, K.; ISHIDA, T.; YAMAMOTO, T.; KUSUHARA, S.; NAKAMURA, T.; HOSONO, T.; IHARA, K.; OHNO, T.; OKAZAKI, Y.; HAYASHIDA, Y.; YOKOYAMA, M.; SATO, T.; IWAMOTO, H.; YAMASHITA, Y.; OTSU, I.; OKAMURA, H.; NAKAMURA, M.; MIYAZAKI, S.; NAKAMURA, T. Prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling induces immunosuppression in human cancer by impairing bioenergetics and ribosome biogenesis in immune cells. *Nature Communications*, v. 15, p. 9464, 2024.
- RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J.A. Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v. 42, p. 15-41, 2016.
- REDONDO, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, v. 296, p. 301-305, 2002.
- 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. 472-478, 2014.
- REICHARDT, S.D.; AMOURET, A.; MUZZI, C.; VETTORAZZI, S.; TUCKERMANN, J.P.; LÜHDER, F.; REICHARDT, H.M. The role of glucocorticoids in inflammatory diseases. *Cells*, v. 10, p. 2921, 2021.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *The New England Journal of Medicine*, v. 353, p. 1711-1723, 2005.
- RICCI, E.; ROSELLETTI, E.; GENTILI, M.; SABBATINI, S.; PERITO, S.; RICCARDI, C.; MIGLIORATI, G. Glucocorticoid-induced leucine zipper-mediated TLR2 downregulation accounts for reduced neutrophil activity following acute dexamethasone treatment. *Cells*, v. 10, p. 2228, 2021.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 31, p. 986-1000, 2011.
- ROH, J.S.; KIM, S.; CHOI, S.J. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network*, v. 18, n. 4, 2018.
- RONCHETTI, S.; RICCI, E.; MIGLIORATI, G.; GENTILI, M.; RICCARDI, C. How glucocorticoids affect the neutrophil life. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 4090, 2018.
- 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- 38, 2005.
- SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; CARDOSO, E. O.; CONTE, F. L.; TASCA, K. I.; ROMAGNOLI, G. G.; GOLIM, M. A.; CRUZ, M. T.; SFORCIN, J. M. Propolis anti-inflammatory effects on MAGE-1 and retinoic acid-treated dendritic cells and on Th1 and T regulatory cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 29, e20220044, 2023.
- SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O'GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin- 10. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 217, p. e20190418, 2020.
- SCHELLER, J.; CHALÁRIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, v. 1813, p. 878–888, 2011.
- SCHMITT, P.; DUVAL, A.; CAMUS, M.; LEFRANÇAIS, E.; ROGA, S.; DEDIEU, C.; LEBRETON, L.; TOUITOU, R.; GIRARD, J.P. TL1A is an epithelial alarmin that cooperates with IL-33 for initiation of allergic airway inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 221, p. e20231236, 2024.
- SCHRODER, W.A.; HIRATA, T.D.; LE, T.T.; GARDNER, J.; BOYLE, G.M.; ELLIS, J.;

- NAKAYAMA, E.; PATHIRANA, D.; NAKAYA, H.I.; SUHRBIER, A. SerpinB2 inhibits migration and promotes a resolution phase signature in macrophages. *Scientific Reports*, v. 9, p. 31455834, 2019.
- SEREZANI, C.H.; KANE, S.; COLLINS, L.; MORATO-MARQUES, M.; OSTERHOLZER, J.J.; PETERS-GOLDEN, M. Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis. *Journal of Immunology*, v. 189, p. 906-915, 2012.
- SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 1-14, 2007.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S.A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFARIDOUN, H.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, p. 6425-6440, 2018.
- SHARMA, B.R.; KANNEGANTI, T.D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nature Immunology*, v. 22, p. 550-559, 2021.
- SHIMASAKI, M.; ICHISEKI, T.; UEDA, S.; HIRATA, H.; KAWAHARA, N.; UEDA, Y. Mesenchymal stem cells preconditioned with hypoxia and dexamethasone promote osteoblast differentiation under stress conditions. *International Journal of Medical Sciences*, v. 21, p. 1511–1517, 2024.
- SIGDEL, T.K.; SUR, S.; BOADA, P.; MCDERMOTT, S.M.; ARLEHAMN, C.S.L.; MURRAY, K.O.; JENKINS, F.J.; HANSEN, K.; NAYAK, U.; VAZQUEZ, L.A.; REYES-TERAN, G.; SARMIENTO-SILVA, R.; NAHMOD, K.; NAHMOD, V.; YANG, J.Y.C.; O'DONNELL, E.; NAIR, V.; BESTARD, O.; ROIG, E.; VALERO, M.; GARCIA, M.; CRESPO, M.; SARWAL, M.M. Proteome analysis for inflammation related to acute and convalescent infection. *Inflammation*, v. 47, p. 346-362, 2024.
- SILVA, B.B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, 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. 100-107, 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.
- SOUZA JÚNIOR, U.P.; CABRERA, S.P.; GUEDES DA SILVA, T.M.; SARMENTO DA SILVA, E.M.; CAMARA, C.A.; SARMENTO SILVA, T.M. Geopropolis gel for the adjuvant treatment of candidiasis – formulation and in vitro release assay. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 29, p. 278-286, 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. 549-558, 2017.
- STENMARK, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 10, p. 513–525, 2009.
- SUGIMOTO, M.A.; SOUSA, L.P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M.M. Resolution of inflammation: what controls its onset? *Frontiers in Immunology*, v. 7, p. 160, 2016.
- TEDER, T.; KÖNIG, S.; SINGH, R.; SAMUELSSON, B.; WERZ, O.; GARSCHA, U.; RAUSCH, M.; STEINHILBER, D.; RÅDBERG, L.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; STARK, H. Modulation of the 5-lipoxygenase pathway by chalcogen-containing inhibitors of leukotriene A4 hydrolase. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 7539, 2023.
- TEDESCO, S.; DE MASI, L.; BARBARIN, A.; FAVERO, E.; GALLI, P.; ROMEO, A.;

- MAZZON, E. THP-1 cells as a model for monocyte/macrophage differentiation: an overview. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, p. 71, 2018.
- TURK, V.; TURK, D.; TURK, B. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1824, p. 68-88, 2012.
- TURNER, I.T.; LIN, C.C.; LIN, W.N.; WU, W.L.; HSIAO, L.D.; YANG, C.M. Lung inflammation caused by adenosine-5'-triphosphate is mediated via  $\text{Ca}^{2+}$ /PKCs-dependent COX-2/PGE2 induction. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 45, p. 1657-1668, 2013.
- 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. 2563-2582, 2014.
- TYANOVA, S.; COX, J. Perseus: a bioinformatics platform for integrative analysis of proteomics data in cancer research. *Methods in Molecular Biology*, v. 1711, p. 133-148, 2018.
- 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, S.; CHU, Y.; YUAN, J.; LI, Y.; LIU, Z.; CHEN, X.; LIU, X.; WANG, Y.; LIU, Q.; LIU, J. Application and prospects of proteomic technology in inflammation: a review. *Food Science and Human Wellness*, v. 13, p. 2373-2385, 2024.
- WILLIAMS, M.A.; O'CALLAGHAN, A.; CORR, S.C. IL-33 and IL-18 in inflammatory bowel disease etiology and microbial interactions. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1091, 2019.
- WINTERBOURN, C.C. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*, v. 528, p. 3-25, 2013.
- YAMAGUCHI, A.; BOTTA, E.; HOLINSTAT, M. Eicosanoids in inflammation in the blood and the vessel. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 997403, 2022.
- YANG, S.; ZHAO, M.; JIA, S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 2023.
- YASIN, R.; MUSTAFA, S.; RAHMAN, M.; HASSAN, R.; ISMAIL, N. THP-1 macrophages: an overview of their use, advantages and limitations in inflammation research. *Journal of Immunological Methods*, v. 510, p. 113347, 2022.
- YUANITA, T.; KUNARTI, S.; ZUBAIDAH, N. East Java propolis effect on toll-like receptor 2 and nuclear factor-kappa B expression in chronic apical periodontitis. *Saudi Endodontic Journal*, v. 3, n. 2, p. 107-112, 2018.
- ZHANG, S.; LIU, Y.; LIANG, Q. Low-dose dexamethasone affects osteoblast viability by inducing autophagy via intracellular ROS. *Molecular Medicine Reports*, v. 17, p. 4307-4316, 2018.
- ZHANG, H.; SHI, N.; DIAO, Z.; CHEN, Y.; ZHANG, Y. Therapeutic potential of TNF- $\alpha$  inhibitors in chronic immune-mediated inflammatory diseases: a review. *Journal of Inflammation Research*, v. 13, p. 721-733, 2020.
- ZHANG, H.; LI, Y.; LIU, Y. An updated review of the pharmacological effects and potential mechanisms of hederagenin and its derivatives. *Frontiers in Pharmacology*, v. 15, p. 1374264, 2024.
- ZOCCAL, K.F.; SORGIA, C.A.; HORI, J.I.; PAULA-SILVA, F.W.; ARANTES, E.C.; SEREZANI, C.H.; ZAMBONI, D.S.; FACCIOLI, L.H. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nature Communications*, v. 7, p. 10760, 2016.
- ZULHENDRI, F.; LESMANA, R.; TANDEAN, S.; CHRISTOPER, A.; CHANDRASEKARAN, K.; IRSYAM, I.; SUWANTARA, I.; TJAHJONO, H.;

WIJAYA, Y.; WATHONI, N.; FELICIA, C.; JALIL, A.T.; ELARAJ, A.; ALBARRAQ, A.A.; SALAM, A.; NAW, A.; KHAN, A. Recent update on the anti-inflammatory activities of propolis. *Molecules*, v. 27, p. 8473, 2022.