



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

Efeitos imunomoduladores da canferide isolada da própolis da caatinga em monócitos humanos

Yuri Bigio Ribeiro de Carvalho

Botucatu, SP

2025



Efeitos imunomoduladores da canferide isolada da própolis da caatinga em monócitos humanos

Yuri Bigio Ribeiro de Carvalho

Orientador: Prof. Titular José Maurício Sforcin

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Botucatu, SP

2025

C331e Carvalho, Yuri
Efeitos imunomoduladores da canferide isolada da própolis da caatinga em monócitos humanos / Yuri Carvalho. -- Botucatu, 2025
39 p. : il., tabs., mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: José Maurício Sforcin

1. Imunologia. 2. Produtos naturais. 3. Cultura celular. 4. Inflamação. 5. Farmacologia. I. Título.

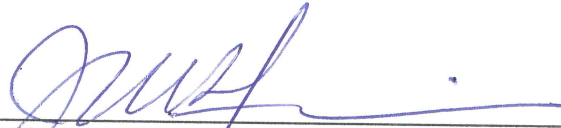
YURI BIGIO RIBEIRO DE CARVALHO

Efeitos imunomoduladores da canferide isolada da própolis da caatinga em monócitos humanos

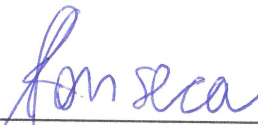
Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Botucatu, 09 de maio de 2025

BANCA EXAMINADORA



Prof. Titular José Maurício Sforcin
Depto. Genética, Microbiologia e Imunologia
IB – UNESP – Campus de Botucatu



Prof. Dr. Paulo Henrique Fonseca do Carmo
Depto. Genética, Microbiologia e Imunologia
IB – UNESP – Campus de Botucatu

Dedico este trabalho

*aos meus pais que possibilitaram-me vivenciar a universidade,
à minha turma de ingresso pela leveza das aulas edificantes,
aos meus amigos por toda a jornada e incentivo,
à minha namorada pela companhia e apoio,
ao meu orientador pela atenciosidade.*

*“Life is short, and potential studies infinite.
We have a much better chance of
accomplishing something significant when
we follow our passionate interests and work
in areas of deepest personal meaning.”
— Stephen Jay Gould*

Agradecimentos

Agradeço em especial e primeiramente aos meus colegas de laboratório (Mariana, Emilly, Pedro e Jônatas) que tornaram este projeto possível e, além disso, tornaram as manhãs, tardes e às vezes noites de trabalho em momentos muito mais divertidos;

Agradeço à docente Lídia Raquel de Carvalho por contribuir à análise de dados, dando uma importante segunda voz sobre como analisar corretamente os dados obtidos;

Agradeço às técnicas Aline e Larissa, do Setor de Microbiologia e Imunologia, pela ajuda essencial durante o decorrer do trabalho;

Agradeço a todos os doadores de sangue por contribuírem com o material para que pudéssemos trabalhar;

Agradeço ao Instituto de Biociências e ao Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia pelo espaço e aprendizado;

Por fim agradeço às agências de fomento FAPESP e PIBIC/CNPq, pelos materiais para a realização dos experimentos e pelo incentivo financeiro.

Obrigado!

Resumo

Nos últimos anos os produtos naturais têm sido objeto de estudo da indústria farmacêutica em busca de novos fármacos. Com este novo interesse da indústria acerca destes compostos, devido a presença de novas tecnologias que permitem estudá-los, a comunidade científica também intensificou seus estudos em torno destes materiais buscando caracterizar suas propriedades químicas, físicas e biológicas. Dentre estes produtos está a canferide, um flavonol o-metilado abundantemente presente em uma série de fontes vegetais e de natureza apícola, como por exemplo a própolis da caatinga nordestina produzida a partir da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., que vem sendo amplamente estudada como uma possível fonte de novos compostos bioativos de interesse para a produção de novos fármacos. Este trabalho busca, portanto, compreender a viabilidade de monócitos humanos após incubação com a canferide e a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias ou relacionadas ao inflamassoma (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, IL-33). A substância será avaliada posteriormente à incubação com LPS quanto à produção de metabólitos do ácido araquidônico (PGE2 e LTB4), bem como quanto à produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e receptores de membrana (CD62L, CD80, HLA-DR, TLR2 e TLR4). Este projeto poderá culminar em novos achados quanto à ação anti-inflamatória deste componente, visando nova abordagem terapêutica, minimizando efeitos colaterais e contribuindo para melhor relação custo-benefício de produtos constituídos pela canferide.

Palavras-chave: Imunologia; Produtos naturais; Cultura celular; Inflamação; Farmacologia.

Abstract

In recent years, natural products have been the subject of study by the pharmaceutical industry in search of new drugs. With this new interest from the industry in these compounds, due to the presence of new technologies that allow their study, the scientific community has also intensified its studies on these materials seeking to characterize their chemical, physical and biological properties. Among these products is kaempferide, an o-methylated flavonol abundantly present in a series of plant and apicultural sources, such as propolis from the northeastern caatinga produced from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., which has been widely studied as a possible source of new bioactive compounds for the production of new drugs. This work therefore seeks to understand the viability of human monocytes after incubation with kaempferide and the production of pro- and anti-inflammatory cytokines or those related to the inflammasome (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, IL-33). The substance will be evaluated after incubation with LPS for the production of arachidonic acid metabolites (PGE2 and LTB4), as well as for the production of reactive oxygen species (ROS) and membrane receptors (CD62L, CD80, HLA-DR, TLR2 and TLR4). This project may culminate in new findings regarding the anti-inflammatory action of this component, aiming at a new therapeutic approach, minimizing side effects and contributing to a better cost-benefit ratio of products consisting of kaempferide.

Keywords: Immunology; Natural products; Cell culture; Inflammation; Pharmacology.

Sumário

| | |
|---|----|
| Introdução | 1 |
| Própolis | 1 |
| Monócitos | 7 |
| Marcadores da Resposta Imune | 9 |
| Metodologia | 11 |
| Obtenção de monócitos e delineamento experimental | 11 |
| Preparo dos Tratamentos..... | 12 |
| Avaliação de viabilidade celular..... | 13 |
| Quantificação de Citocinas | 13 |
| Quantificação de derivados do Ácido Araquidônico | 14 |
| Expressão de receptores de membrana | 14 |
| Atividade bactericida..... | 14 |
| Produção de espécies reativas do oxigênio | 15 |
| Análise de dados | 16 |
| Resultados e discussão | 16 |
| Avaliação de viabilidade celular..... | 16 |
| Quantificação de Citocinas..... | 17 |
| Análise de citocinas em condição metabólica basal | 17 |
| Análise de citocinas com indução de quadro inflamatório | 19 |
| Quantificação de Derivados do Ácido Araquidônico | 20 |
| Expressão de receptores de membrana | 21 |
| Atividade bactericida..... | 23 |
| Produção de espécies reativas do oxigênio | 24 |
| Conclusão | 25 |
| Referências bibliográficas | 25 |

Introdução

Própolis

A própolis, produto opoterápico popularizado nas últimas décadas, é um material resinoso produzido por plantas e coletado por abelhas (família Apidae), que a misturam com excreções salivares, enzimas e ceras, e então utilizam-na para selar aberturas na colmeia (SFORCIN, 2007), função esta que possivelmente lhe conferiu o nome própolis na antiguidade (do grego, *pró* = em defesa de; e *polis* = cidade). Além da função de selar rachaduras, a própolis também é utilizada pelas abelhas para fortalecer a estrutura da colônia, especialmente nos pontos onde a colmeia está anexada a outro material (como um tronco de uma árvore, por exemplo) e em sua entrada, garantindo estabilidade e prevenindo o contato direto da colônia com o meio externo. Ambas as utilizações mencionadas acima são possíveis por conta rigidez da própolis, que apresenta consistência semelhante à da cera de abelha.

Contudo, além de sua utilidade como um material moldável e resistente, as suas propriedades biológicas, como antibacteriana e antifúngica, são de extrema importância para as abelhas, já que estas vivem em colmeias com alta densidade de indivíduos e que ameaças sanitárias podem facilmente colocar em risco a sobrevivência do enxame. Para se prevenir de tal risco, as abelhas passaram, ao longo de sua história evolutiva, a revestir a superfície interna da colmeia com própolis, assim como o interior dos favos de mel, onde ocorre o desenvolvimento das larvas, e até a cobrir invasores que foram mortos pelo enxame no interior da colmeia e não puderam ser retirados, prevenindo que estes entrem em decomposição e favoreçam a proliferação de fungos e bactérias potencialmente danosos à colônia (BANKOVA *et al.*, 2000; KUROPATNICKI *et al.*, 2013).

Apesar de tais efeitos serem amplamente estudados e discutidos na atualidade, a própolis está longe de ser uma novidade para a humanidade. Acredita-se que os registros mais antigos referentes à utilização da própolis sejam datados por volta de 1700 A.C, onde um material resinoso nomeado *tzori*, descrito em escrituras do povo hebreu, apresenta propriedades muito semelhantes à da própolis. O *tzori* aparece em escrituras seis vezes, e em uma delas, no capítulo Genesis, da Torah judaica, é mencionado que o *tzori* é transportado junto ao mel para o Egito, além de ser descrito como uma substância de origem vegetal com propriedades curativas. Além do *tzori*, algo descrito pelos egípcios no Papiro Ebers, um dos mais antigos registros de práticas

médicas da humanidade (1550 A.C), como “cera preta”, também é um possível nome antigo para a própolis (CRANE, 1997).

Os registros passam ser mais precisos durante o Império Romano, quando Dioscorides de Pedanius, um médico grego que serviu ao exército romano, fala a respeito dos efeitos medicinais da própolis, utilizando seu nome atual, e descrevendo sua origem animal/vegetal (KUROPATNICKI *et al.*, 2013; Diosc. *et* Lag. Andrés, *De Materia Medica*, II, 178). Este registro menciona o uso da própolis para o tratamento de infecções de pele e de garganta, uso este que foi continuado por médicos de origem árabe durante a Idade Média. Na Idade Moderna há registros da própolis para além dos usos médicos, tornando-se utilizada como verniz e resinas para instrumentos de corda (SILVA-CARVALHO, 2015). Durante o início da Idade Contemporânea, a própolis foi considerada um fármaco oficial pela farmacopeia britânica e durante o século XX foi extensivamente utilizada na União Soviética como um remédio barato e altamente difundido nos países antes pertencentes a ela, além de ter sido utilizado para tratar feridas de soldados durante a Segunda Guerra Mundial (CASTALDO *et* CAMPASSO, 2002; SILVA-CARVALHO, 2015).

Após esta longa história, foi só no fim do século XX, época marcada pelo avanço técnico-científico e hegemonia do método científico, que a própolis passou a ser estudada com mais profundidade, sendo publicados centenas de artigos explorando suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatórias, antiparasitária e antioxidante (SFORCIN, 2007). Estes estudos partem da ideia de que a própolis tem potencial como uma grande fonte de constituintes bioativos para o desenvolvimento de fármacos com custos menores e risco de efeitos colaterais reduzido (SFORCIN, 2007), em comparação aos fármacos convencionais.

A partir destes estudos acerca da própolis conduzidos pela comunidade científica internacional, notou-se que, por se tratar de um complexo altamente variável de acordo com a localização geográfica, não faria sentido referir-se a ela genericamente como “própolis” e sim descrever a amostra quimicamente ao realizar os experimentos e publicar trabalhos (BANKOVA, 2005).

Inicialmente, as amostras de própolis passaram a ser definidas pela cor que apresentavam ou seus respectivos países de origem, como “própolis verde” ou “própolis brasileira”, nomes estes que, a partir de uma análise química, deixaram de ser definitivos para possíveis efeitos e constituição. Isto porque uma amostra coletada da mesma colmeia pode

variar de coloração a depender da estação na qual foi coletada, mesmo que possivelmente não haja diferença significativa entre os seus compostos ativos (normalmente não há diferença em países tropicais como o Brasil, onde a atividade das abelhas não varia sazonalmente. Estudos realizados em zonas temperadas mostram alta influência da variação sazonal na constituição química da própolis (VALENCIA *et al.*, 2012)). O mesmo pode acontecer para amostras que foram coletadas no mesmo país e, portanto, receberam o mesmo nome, mas que, apesar de fazer parte das mesmas fronteiras geopolíticas, podem ser altamente variadas a depender de qual parte do país foram coletadas (SALATINO *et al.*, 2005). Assim, a maneira mais eficiente de estudar a própolis passou a ser através da definição das amostras pela sua origem botânica e perfil químico, o que permitiu com que fossem comparadas de maneira mais criteriosa e adequada (BANKOVA, 2005).

De acordo com Park *et al.* (2002) e Alencar *et al.* (2007), existem ao menos 13 tipos de própolis no território brasileiro, definidos através da comparação entre as constituições químicas das amostras e a observação de quais espécies vegetais as abelhas visitavam para produzir determinada amostra. Além disso foram pareadas as substâncias da amostra de própolis e da planta que é supostamente visitada, como forma de confirmação.

Em Salatino *et al.* (2021) encontra-se apresentada uma tabela com os principais tipos de própolis brasileira, com seus respectivos constituintes principais e suas fontes botânicas (**Tabela 1**).

Tabela 1: Tipos mais comuns de própolis no Brasil (adaptado de SALATINO *et al.*, 2021).

| Type | Biome | Chemical profile | Plant origin |
|-----------------|-------------------------|--|---|
| Amazonian black | Amazonian forest | Polyisoprenylated benzophenones | <i>Clusia</i> sp. |
| Brown | <i>Araucaria</i> forest | Varied | <i>Araucaria</i> , <i>Populus</i> , other native and cultivated plant species |
| Dark | Atlantic Forest | Xanthenes, steroids | <i>Symphonia globulifera</i> |
| Dark | “Campos rupestres” | Prenylated flavonols | Velloziaceae (?) |
| Green | Cerrado | Prenylated phenylpropanoids, triterpenoids | <i>Baccharis dracunculifolia</i> , <i>Vernonia rubriramea</i> |
| Green | Caatinga | Chalcones, flavonols | <i>Mimosa tenuiflora</i> |
| Red | Mangrove | Chalcones, isoflavonoids, prenylated benzophenones | <i>Dalbergia ecastaphylum</i> , <i>Symphonia globulifera</i> |
| Yellow | Pantanal | Steroids, triterpenoids | Undetermined |

Cada componente presente no perfil químico das amostras pode influenciar o efeito biológico da amostra (SFORCIN, 2016), tornando-a mais eficiente para determinadas ações (ex.: própolis ricas em flavonóis, flavonas e polifenóis parecem atuar como inibidoras da formação de biofilme por *Streptococcus mutans* de maneira correlacionada à concentração destas substâncias (VELOZ *et al.*, 2015)).

Já foram identificados mais de 500 componentes nos diversos tipos de própolis, podendo variar de acordo com a fonte botânica disponível, localização geográfica, estação, genética das abelhas que a produziram e outros fatores ambientais. Contudo, além das variações naturais a que a própolis está sujeita, os métodos de coleta e extração também podem alterá-la. A escolha de determinado método, solvente e sua concentração, podem alterar significativamente o perfil químico da amostra estudada. Entre os solventes mais utilizados estão o etanol, em variáveis concentrações, a água e o metanol (Šuran *et al.*, 2021).

Os efeitos observados no estudo dos variados tipos de própolis se dão como um resultado da ação isolada e da interação dos diversos componentes que a constituem, o que torna interessante a investigação dos efeitos de tais componentes isolados como possíveis alvos farmacológicos.

O presente trabalho parte da análise de um dos constituintes de uma amostra de própolis verde produzida na caatinga brasileira, a canferide. A caatinga brasileira é um bioma com clima semiárido, contando com chuvas pontuais e volumosas, o que faz com que ele possua uma vegetação única adaptada a longos períodos de seca. Este bioma, além de suportar grande diversidade, estende-se por grande parte do país, ocupando por volta de 844,453 km² região nordeste do Brasil (**Fig. 1**) (ALVARES *et al.*, 2013; SILVA *et* SOUZA, 2018). Essas condições fazem com que a própolis produzida na região seja distinta quimicamente das demais amostras coletadas em outras regiões do mundo e, portanto, torna-a capaz de apresentar um conjunto de efeitos farmacológicos únicos.



Figura 1: Extensão da caatinga (DA SILVA *et al.* LACHER, 2019)

A própolis encontrada na caatinga brasileira tem como fonte botânica a espécie *Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir., conhecida popularmente na região como “Jurema-Preta” e utilizada em uma preparação alucinógena pelos povos originários habitantes da região para a prática de rituais religiosos (SON *et al.*, 2022; DE SOUZA *et al.*, 2008). As abelhas cortam as gemas de plantas jovens e misturam-na com os demais constituintes da própolis, como cera, resinas, óleos e pólen, conferindo-a uma coloração esverdeada.

Em Son *et al.* (2022) foi apresentada a análise dos constituintes da amostra de própolis da caatinga por cromatografia líquida de alta performance (CLAP), que apresentou alta quantidade de compostos fenólicos, distribuídos em flavonóis e flavononas, sendo uma delas prenilada (com um grupo hidrofóbico prenilo). Através da CLAP realizada no artigo é possível verificar que a canferide (7) aparece em alta quantidade, tanto no extrato da amostra de própolis quanto no extrato de *M. tenuiflora* (Fig. 2). Tal registro é novidade entre as amostras de própolis no Brasil, nas quais acreditava-se possuírem como principais compostos somente derivados do terpeno e do ácido *p*-cumárico.

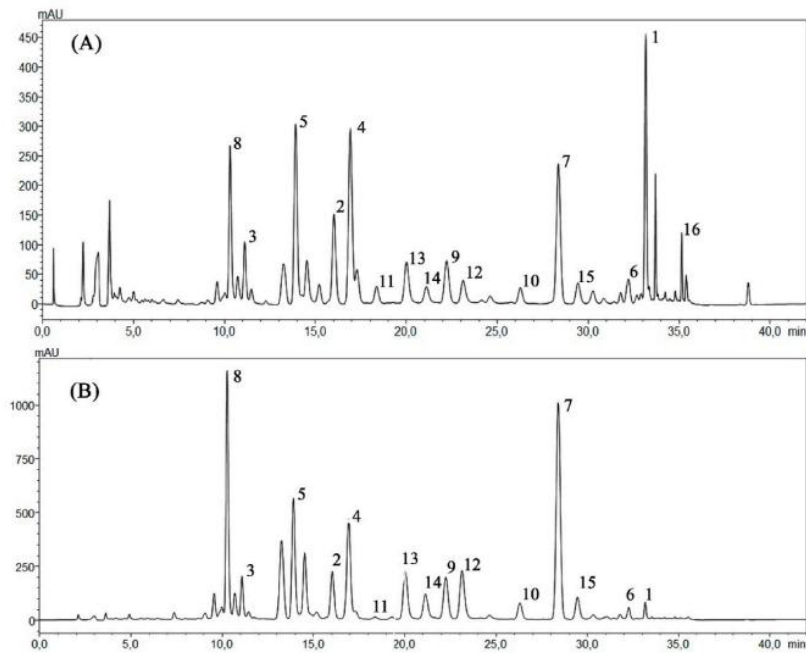


Figura 2: Análise dos extratos hidroalcoólicos (90%) de própolis (A) e *M. tenuiflora* (B). $\lambda = 286 \text{ nm}$ (SON *et al.*, 2022).

A canferide é pertencente à classe química flavonol e definida pelo radical hidroxila (OH) ligada a um grupo fenol, parte da estrutura básica dos flavonoides. Apesar de ter sido recentemente encontrada em *M. tenuiflora* e na amostra de própolis derivada desta fonte botânica, está presente em uma série de plantas, principalmente àquelas pertencentes a família *Zingiberaceae* (SONG *et al.*, 2024). Sua estrutura química (**Fig. 3**) é muito semelhante à de outros membros de sua mesma classe química, como o canferol ou galangina, porém apresenta efeitos farmacológicos bem diferentes destes dois componentes, indicando que pequenas diferenças na estrutura dos flavonóis podem modificar profundamente seus efeitos (LEE *et al.*, 2008).

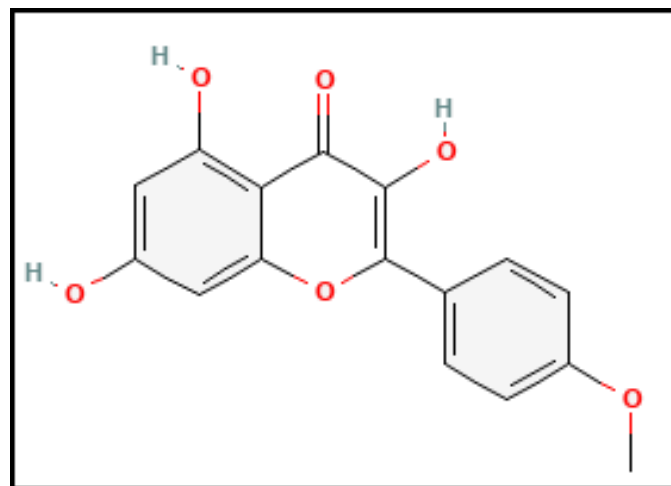


Figura 3: Estrutura química da canferide.

Existem muitos estudos acerca dos efeitos dos flavonoides e suas atividades na saúde humana, porém, estudos a respeito da canferide ainda são muito recentes e pouco numerosos, tendo sido realizados, em sua maioria, sobre linhagens de células tumorais (SONG *et al.*, 2024).

O estudo de Sartori *et al.* (2024) avaliou a ação da própolis de *M. tenuiflora* e três de seus componentes (santina, canferide e sakuranetina) sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMC, em inglês) e concluiu que a canferide é um dos compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória observada no tratamento das células pela própolis.

O presente trabalho buscou aprofundar-se sobre os efeitos da canferide sobre os monócitos humanos, células do sistema imune que compõem em torno de 10% das PBMC.

Monócitos

Os monócitos são células da linhagem mieloide com um único núcleo em forma de rim. Junto deles, outros dois tipos celulares, o macrófago e as células dendríticas, formam o sistema mononuclear fagocitário. Após sua diferenciação a partir de células precursoras na medula óssea, os monócitos migram para a circulação sistêmica (através principalmente do receptor quimiotático CCR2) e podem cumprir diversas funções baseado em seus respectivos tipos (JAKUBZICK *et al.*, 2017).

Existem três diferentes subtipos de monócitos circulantes no corpo humano, o monócito clássico, definido pelos marcadores CD14⁺ e CD16⁻, o monócito não clássico, CD14⁻ e CD16⁺, e os monócitos intermediários, CD14⁺ e CD16⁺. Apesar de divididos em subtipos, os monócitos são células com alta plasticidade e podem mudar de perfil ao longo de sua vida, alterando seu metabolismo, tamanho, granulosidade e perfil de produção de citocinas (PATEL *et al.*, 2017). Outros estudos abordam a existência de mais subtipos, identificáveis pelo padrão transcricional distinto entre eles (KAPELLOS *et al.*, 2019).

Nesta monografia, a população abordada pertence ao subtipo clássico, especializada na infiltração tanto de tecidos linfóides quanto não-linfóides, onde podem exercer diversas funções a depender das interações realizadas nos respectivos tecidos. Quando os tecidos estão em homeostase (**Fig. 4a**), os monócitos infiltram-nos com menor frequência, e dentro deles podem sofrer diversas modificações, como passar a expressar o MHCII (moléculas de

histocompatibilidade molecular de classe 2) e até a transformar-se em macrófagos residentes, mesmo que a maioria destes tenha origem embrionária e sua permanência no tecido seja feita majoritariamente pela proliferação local da população residente (JAKUBZIC *et al.*, 2017; HASHIMOTO *et al.*, 2013). Quando os tecidos estão em processo de inflamação (Fig. 4b), o influxo de monócitos é maior devido a expressão de moléculas de adesão nas paredes do endotélio sob influência de fatores quimiotáticos produzidos no sítio de infecção (IMHOF *et al.*, 2004; BOSCH *et al.*, 2023). Após a infiltração, a presença de fatores estimulantes (lipopolissacarídeos, fragmentos de células, citocinas pró-inflamatórias) induzem a transformação dos monócitos, fazendo com que se diferenciem em células dendríticas (MHCII⁺ monocyte-derived DC, Tip-DC) ou macrófagos do tipo M1 e M2. Caso o nicho de macrófagos residentes esteja aberto, os monócitos também podem diferenciar-se em macrófagos MERTK⁺ (JACUBZICK *et al.* 2017).

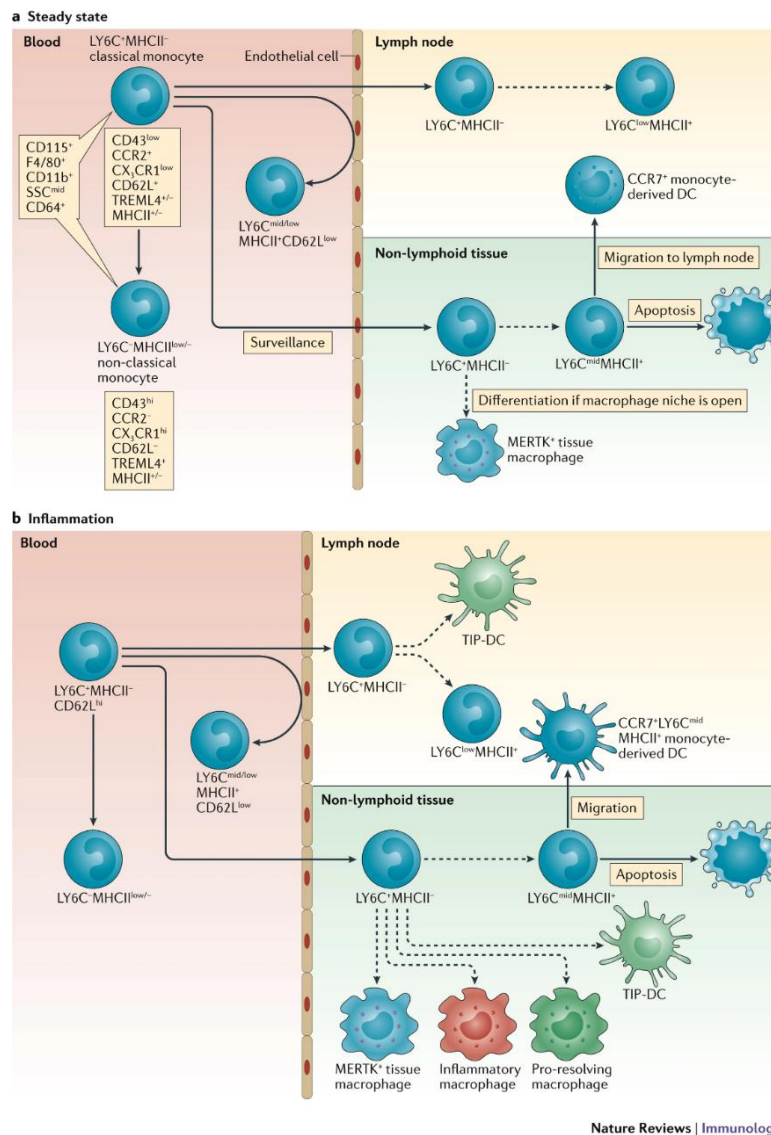


Figura 4: Processo de maturação dos monócitos em situação de homeostase (a) e inflamação (b), por Jakubzic *et al.* (2017).

A escolha deste tipo celular e subgrupo para a realização do trabalho se dá devido às funções que os monócitos realizam sistemicamente, contribuindo significativamente para a homeostase, resposta imune inata e adaptativa, formação do processo inflamatório e reparo tecidual (GINHOUX *et JUNG*, 2014). Após o tratamento dos monócitos com canferide, tais funções foram avaliadas a partir de marcadores moleculares.

Marcadores da Resposta Imune

A resposta imune pode ser definida como o conjunto de mecanismos, substâncias químicas ou estruturas capazes de identificar e responder a estímulos reconhecidos como *non-self* pelo organismo. As ações podem ser de natureza anatômica, como uma barreira protetora para o meio exterior (pele), química, como a presença de HCl no estômago que elimina patógenos ingeridos na alimentação, ou biológica, na formação de complexos proteicos especializados para a detecção e eliminação de estruturas patogênicas (PAMPs e DAMPs). A resposta biológica conta com inúmeros efetores, as células, que unem o físico e o químico através da produção de sinais químicos e mecanismos estruturais que são responsáveis pela comunicação dentro do sistema imunológico, a qual é essencial para seu funcionamento correto, e pela eliminação de ameaças para o organismo.

Essas sinalizações e mecanismos possuem padrões estruturais específicos que, por sua vez, conferem funções biológicas específicas. Ao longo da história evolutiva da vida na terra, tais padrões tornaram-se cada vez mais refinados através de uma grande gama de efetores e tipos de resposta. Entre um dos mais refinados está o sistema imune humano que, devido a grande história de migrações de nossa espécie e nossos antepassados, entrou em contato com grande diversidade de patógenos que exerceram pressão seletiva sobre o sistema imune destas populações, selecionando um sistema extremamente sofisticado que foi herdado pela nossa espécie (DOMÍNGUEZ-ANDRÉS *et NETEA*, 2019).

Devido à sua complexidade, este sistema passou a ser estudado através de marcadores específicos (CD, do inglês *cluster of differentiation*) e tipo de comunicação estabelecidas entre eles (citocinas).

Durante uma inflamação, por exemplo, grupos de células específicas, reconhecidas pelas proteínas em suas membranas, ou CDs, reagem, através de seus receptores (PRRs) à presença de um antígeno e tem suas vias pró-inflamatórias ativadas, induzindo a produção citocinas pró-inflamatórias para se comunicar com células próximas e alterando seus metabolismos, fazendo

com que, a depender do tipo celular que elas pertencem, produzam lisozimas, espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio para o combate do patógeno. Na ausência de patógenos, as células anteriormente ativadas passam a assumir um perfil resolutivo, interrompendo o processo inflamatório e reconstruindo o tecido (CHEN *et al.*, 2018). Caso não ocorra essa mudança de perfil, a inflamação pode tornar-se crônica e se tornar a causa da doença (LIBBY, 2007).

As mudanças de perfil, tanto para um perfil pró-inflamatório quanto anti-inflamatório, são comunicadas através das citocinas, proteínas produzidas pelas células do sistema imune que podem ser detectadas pelos receptores de outras células através da ligação a receptores. Através da identificação destas citocinas e do estudo da reação das células de defesa à presença delas, é possível compreender quais suas funções e utilizá-las como biomarcadores (CHEN *et al.*, 2018). Centenas de citocinas já foram identificadas desde que passaram a ser estudadas. Em Chen *et al.* (2018), foi apresentada uma tabela com algumas das principais citocinas presentes no processo inflamatório, as principais células que as produzem e suas respectivas funções (Tabela 2).

Tabela 2: Principais citocinas envolvidas no processo inflamatório (CHEN *et al.*, 2018).

| Cytokine | Family | Main sources | Function |
|---------------|--------|--|--|
| IL-1 β | IL-1 | Macrophages, monocytes | Pro-inflammation, proliferation, apoptosis, differentiation |
| IL-4 | IL-4 | Th-cells | Anti-inflammation, T-cell and B-cell proliferation, B-cell differentiation |
| IL-6 | IL-6 | Macrophages, T-cells, adipocyte | Pro-inflammation, differentiation, cytokine production |
| IL-8 | CXC | Macrophages, epithelial cells, endothelial cells | Pro-inflammation, chemotaxis, angiogenesis |
| IL-10 | IL-10 | Monocytes, T-cells, B-cells | Anti-inflammation, inhibition of the pro-inflammatory cytokines |
| IL-12 | IL-12 | Dendritic cells, macrophages, neutrophils | Pro-inflammation, cell differentiation, activates NK cell |
| IL-11 | IL-6 | Fibroblasts, neurons, epithelial cells | Anti-inflammation, differentiation, induces acute phase protein |
| TNF- α | TNF | Macrophages, NK cells, CD4 ⁺ lymphocytes, adipocyte | Pro-inflammation, cytokine production, cell proliferation, apoptosis, anti-infection |
| IFN- γ | INF | T-cells, NK cells, NKT cells | Pro-inflammation, innate, adaptive immunity anti-viral |
| GM-CSF | IL-4 | T-cells, macrophages, fibroblasts | Pro-inflammation, macrophage activation, increase neutrophil and monocyte function |
| TGF- β | TGF | Macrophages, T cells | Anti-inflammation, inhibition of pro-inflammatory cytokine production |

As citocinas, além de mediar a resposta da imunidade inata, que oferece rápida reação aos antígenos através do processo inflamatório, também são responsáveis pela ativação da imunidade adaptativa, que gera memória e induz a produção de anti-corpos específicos para os patógenos detectados. Para que seja ativada adequadamente, é necessária uma série de interações entre múltiplos agentes do sistema imunológico, as células apresentadoras de antígenos (APCs), células T e as células B (MARSHALL *et al.*, 2018).

Neste trabalho analisamos os efeitos imunomodulatórios da canferide na resposta produzida por uma população purificada de monócitos humanos *in vitro*, em condições basais e através da simulação de inflamações induzida por LPS seguida da incubação com canferide e, por fim, da análise e comparação de parâmetros relacionados com a formação do inflamassoma e sua resolução nos diferentes grupos observados. Assim, foi avaliada inicialmente a viabilidade de monócitos incubados com canferide, a produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e IL-33) e de eicosanoides (PGE2 e LTB4), a expressão de marcadores de superfície celular (TLR-2, TLR-4, HLA-DR CD62L e CD80), a atividade bactericida de monócitos contra *Staphylococcus aureus* meticilina-sensível (cepa ATCC29213) e a produção de espécies reativas do oxigênio.

Metodologia

Obtenção de monócitos e delineamento experimental

Cinco pacientes saudáveis, adultos, não-fumantes, não-obesos e sem histórico de uso de álcool ou medicamentos nos três dias anteriores à coleta, doaram voluntariamente amostras de sangue que variavam entre 9mL a 80mL. As amostras foram então divididas em tubos de 20mL, heparinizadas com 0.2mL de heparina sódica e centrifugadas (200g, 10 minutos). Após a centrifugação, foi descartado o plasma sanguíneo e adicionado 15mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) para cada tubo. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente divididas em 3 diferentes tubos, cada um deles contendo 4mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Biosciences, Suécia) e centrifugados (300g, 30 minutos). Com as células separadas por um gradiente de densidade, o halo celular formado acima da camada de Ficoll-Paque foi coletado e purificado através de 2 lavagens (300g por 10 minutos, remoção do sobrenadante e ressuspensão utilizando meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB)). Com o halo celular coletado, no qual

contém as PBMC, foi feito o isolamento dos monócitos utilizando *beads* magnéticas através de seleção negativa.

Os monócitos foram isolados seguindo o *data sheet* do kit Classical Monocyte Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Alemanha) que, através de *beads* magnéticas, prende as células CD3+, CD7+, CD16+, CD19+, CD56+, CD123+ e CD235a+ a uma coluna magnetizada, adquirida junto com o kit, permitindo que somente células que não contêm estas estruturas (CDs) passem pela coluna e sejam coletadas.

Após o isolamento dos monócitos, estes foram distribuídos em placas de 24 poços (250µL de solução por poço, 2×10^6 células/mL) incubados durante 18 horas, a 37°C e 5% CO₂ com os devidos tratamentos (250µL por poço). As células foram colocadas em duas diferentes condições experimentais. Na primeira condição (1) os monócitos foram avaliados em condições basais e as células foram tratadas com: meio RPMI 1640 (controle), LPS (0,1µg/mL) e canferide (200µM ou múltiplas concentrações, a depender do experimento).

A outra condição experimental (2) consistiu na indução da inflamação através da adição de LPS (0,1µg/mL) às células seguida da incubação por 2 horas antes do tratamento com a canferide, gerando os seguintes grupos: células sem LPS e meio RPMI 1640 (controle basal), células com LPS e meio RPMI 1640 (controle positivo), células com LPS e canferide (200µM ou múltiplas concentrações, a depender do experimento).

Preparo dos Tratamentos

A canferide utilizada para o tratamento dos monócitos tem duas origens distintas. Inicialmente foi utilizado o composto isolado da própolis da caatinga que havia sido utilizado em pesquisas anteriores e estava armazenado a -20°C (SARTORI *et al.*, 2024). Contudo, para a realização de todos os testes, foi utilizada também canferide liofilizada (Phytolab, Alemanha). Ambas as amostras passaram pelos mesmos procedimentos quanto à diluição em DMSO e, em seguida, ajustadas para as concentrações desejadas através de diluições com meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após o ajuste das concentrações, as amostras diluídas foram filtradas em filtros Milipore de 30mm de diâmetro e poros medindo 0,22µm diâmetro (Kasvi, Brasil).

Avaliação de viabilidade celular

A avaliação da viabilidade celular foi feita através do ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT – Sigma-Aldrich Corporation, USA). Após a incubação os sobrenadantes foram removidos e foi adicionado MTT (1mg/mL) e as células foram incubadas novamente por 3 horas. Após a incubação, o MTT foi removido e foi adicionado DMSO (0.2%). A leitura de absorbância foi realizada a 540nm e os resultados foram analisados em porcentagem. O grupo de células não tratadas (incubadas somente com meio RPMI 1640, 10% SFB) foi considerado como 100% de viabilidade celular (SARTORI *et al.*, 2024).

Quantificação de Citocinas

A determinação da concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e IL-33 foi realizada através da técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) com os sobrenadantes das culturas celulares, coletados após a incubação das culturas celulares com os tratamentos e congelados a -80°C. Foi mensurada a concentração de citocinas em ambas as condições experimentais, com a canferide em múltiplas concentrações na análise basal (condição 1) e com somente uma concentração (200 μ M) na segunda condição, com indução da inflamação via LPS. Inicialmente, foi adicionado 100 μ L de salina tamponada com fosfato (PBS) e anticorpos de captura monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R&D Systems, EUA e BioLegend, EUA) às placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc, EUA) seguida de uma incubação *overnight* a 4°C em câmara úmida. Após 3 lavagens dos poços com PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), foi realizado o bloqueio dos poços com albumina sérica bovina (BSA, 10%) (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS para saturação dos sítios de ligação e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Uma nova sequência de lavagens foi realizada e, a seguir, alíquotas de 100 μ L das amostras foram adicionadas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados, e foi feita a adição de 100 μ L da solução de anticorpos de detecção policlonal biotilado e do conjugado estreptavidina-peroxidase, e foi feita outra incubação novamente, por 20 minutos. Novas lavagens foram realizadas e foram adicionados 100 μ L da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB). Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ 2N e as absorbâncias foram imediatamente lidas por um leitor de ELISA a 450 nm.

Quantificação de derivados do Ácido Araquidônico

Os tratamentos utilizados neste experimento foram: controle basal (células + meio RPMI 1640(10%SFB), controle positivo (células desafiadas com LPS(0.1µg/mL) e meio RPMI 1640(10% SFB) e células estimuladas por canferide (200µM) após 3 h sobre o estímulo do LPS. Foram avaliados dois derivados do ácido araquidônico, a prostaglandina E2 (PGE2) e o leucotrieno B4 (LTB4). As análises foram feitas através do método de ELISA competitivo, utilizando os kits Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit (R&D Systems, EUA) e LTB4 Parameter Assay Kit (R&D Systems, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas a 414nm utilizando um leitor de ELISA.

Expressão de receptores de membrana

Foi avaliada a expressão dos receptores de membrana TLR-4, TLR-2, HLA-DR, CD62L e CD80 por citometria de fluxo, sobre os monócitos na condição experimental 1 e sobre somente uma concentração de canferide (200µM). Foram adicionados 300µL de tripsina/EDTA (0.25%; Gibco, EUA) a cada um dos poços e realizada uma incubação de 4 minutos a 37°C e 5% de CO₂, para auxiliar na remoção das células adsorvidas à placa. Em seguida, foram adicionados 300µL de soro fetal bovino sobre a tripsina/EDTA e as células foram removidas e passadas para tubos FACS, específicos para citometria. Então, as amostras foram lavadas e ressuspensas em 30µL PBS + 0,5% de BSA e incubadas por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo de luz, com anticorpos monoclonais específicos fluoresceinados anti-TLR2, anti-TLR4, anti-HLA-DR, anti-CD62L e anti-CD80, conjugados com seus respectivos marcadores (PE, APC, FITC, PE/Cy7 e PE). Para a análise, foi adicionado anticorpo monoclonal anti-CD14 com PE/Cy7 para verificar se a população era realmente formada por monócitos clássicos (CD14+). Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em 270 µl de PBS + 0,05% de BSA, fixadas com 30µL de solução de fixação com 5% paraformaldeído em PBS e analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). Nos testes foram incluídos também um grupo de controle isotípico marcados com os fluorocromos da mesma classe dos anticorpos utilizados nos testes, porém sem a mesma especificidade, a fim de eliminar possível fluorescência inespecífica.

Atividade bactericida

Foi realizado o cultivo da bactéria *Staphylococcus aureus* sensível a meticilina (cepa ATCC 29213) no dia anterior ao experimento, em ágar BHI (Kasvi, Brasil). Poucos minutos

antes da realização do experimento, as bactérias foram coletadas do ágar e ajustadas na escala McFarland 0,5.

Os monócitos foram colocados sobre a condição experimental 1 e a canferide foi avaliada somente na concentração de 200 μ M. Após 18 h de incubação, o sobrenadante foi removido e as bactérias foram adicionadas sobre as células, na proporção de 20 bactérias para cada monócito, onde permaneceram por 90 minutos a 37°C e 5% CO₂. Além do controle basal (monócitos não-tratados + bactérias) também foi adicionado um poço contando somente com bactérias e meio como controle positivo. Após incubação, o sobrenadante foi coletado e os poços foram lavados com 1mL de água destilada. O produto da lavagem foi adicionado ao sobrenadante de cada poço em tubos de ensaio, gerando 1,5mL de solução. Por fim, 0,5mL dessa solução foi semeada em meio BHI, e as placas foram incubadas por 48 h a 37°C.

Ao final da incubação, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e a porcentagem de atividade bactericida foi calculada pela fórmula: % = (1 – [média de UFCs das placas experimentais/média de UFCs das placas de controle positivo]) \times 100.

Produção de espécies reativas do oxigênio

Para a avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado o método de detecção por DCFH-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína). As células foram submetidas à condição experimental 2 e tratadas somente com canferide (200 μ M). Ao final da incubação com o tratamento, foi adicionado 300 μ L de tripsina/EDTA (0.25%; Gibco, EUA) sobre as células e a placa foi incubada por 4 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de soro fetal bovino sobre a tripsina/EDTA e as células foram coletadas e cada poço foi dividido para dois tubos FACS. Então, foi realizada a lavagem (centrifugação em 300g por 7 minutos e descarte do sobrenadante) dos tubos, ressuspensão das células com 500 μ L da solução de DCFH-DA diluído a 1 μ M com PBS em somente um dos dois tubos de cada poço e, em sequência, incubação por 40 min. Os outros tubos serviriam como controles não-marcados e, portanto, foram ressuspensos somente com 200 μ L de PBS. Posterior a incubação, os tubos foram lavados e metade deles foram ressuspensos com 1mL de água oxigenada diluída à concentração de 5mM em PBS e incubadas por 10 minutos. Os demais tubos foram ressuspensas com 200 μ L de PBS para serem utilizados como controles não-estimulados. Finalizada a incubação dos tubos com H₂O₂, foram adicionados 3mL de PBS para diluir a água oxigenada e foi feita mais uma lavagem. Por fim, as células foram ressuspensas em 150 μ L de PBS e analisadas por citometria de fluxo.

Análise de dados

A análise dos dados foi realizada através do *software* R (versão 4.4.3). Em razão da dependência dos estados e da distribuição não-gaussiana dos dados e dos resíduos, os testes utilizados foram o Teste de Friedman, junto do Teste de Conover (CONOVER, 1999) com o ajuste de Holm-Bonferroni (AICKIN *et* GENSLER, 1996). Para os ensaios de atividade bactericida e de marcadores de superfície, foi utilizado o teste *post-hoc* de Nemenyi (NEMENYI, 1963). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados e discussão

Avaliação de viabilidade celular

A viabilidade celular da canferide foi verificada através da realização do ensaio de MTT com múltiplas concentrações de canferide (KF50, KF100 e KF200 (valores referentes a concentração em μM) e do solvente (DMSO) utilizado para diluí-las. Os resultados obtidos estão representados abaixo (**Fig. 5**).

Apesar da queda na viabilidade celular observada na concentração de $200\mu\text{M}$ da canferide com LPS (**Fig. 5b**), ela, junto das demais condições, permaneceram acima de 70% de viabilidade, valor que determina não-citotoxicidade de acordo com a ISO 10993-5 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

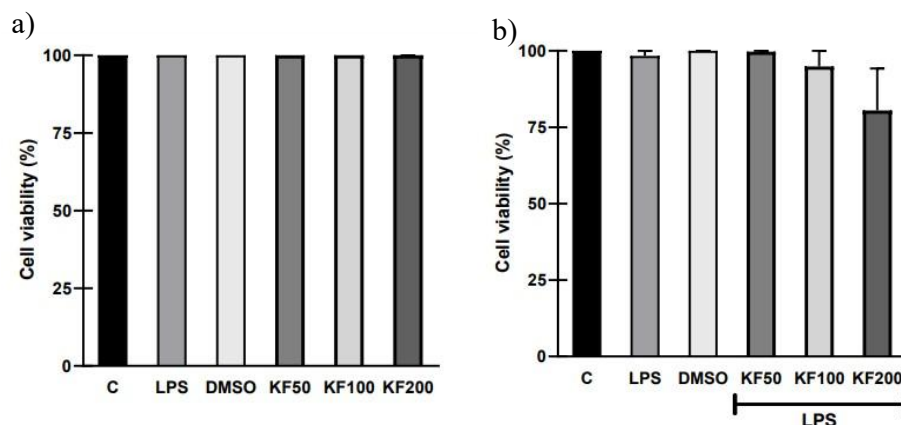


Figura 5: Viabilidade (%) de monócitos após incubação com RPMI 1640 (controle – C), lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL) ou com canferide (KF – 50, 100 e 200 μM) em condição basal (a) e com LPS (b).

Quantificação de Citocinas

As citocinas analisadas como proposto foram TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18 e IL-33. Apesar da citocina CXCL-8 ter sido avaliada múltiplas vezes, os resultados mostraram que o teste não estava funcionando (a curva-padrão, usada como parâmetro para avaliar o funcionamento do teste, não forneceu os resultados necessários para que o teste fosse dado como confiável).

As análises de citocinas foram separadas em dois diferentes grupos, àquelas avaliadas com as células em condição metabólica basal e aquelas avaliadas após a indução do quadro inflamatório.

Análise de citocinas em condição metabólica basal

As células estimuladas por LPS mostraram aumento na produção de quase todas as citocinas, mostrando que as células de fato estavam responsivas à estímulos externos. As citocinas IL-10 e IL-33 não apresentaram diferenças entre o controle positivo e negativo, assim como entre o restante dos tratamentos (**Fig. 6**). Este perfil de resposta era esperado pois a IL-10 é uma citocina cujo pico de produção se dá 24 h após o estímulo inflamatório inicial, atuando principalmente na resolução da inflamação (SALEZ *et al.*, 2000; CARLINI *et al.*, 2023), e os sobrenadantes foram coletados após 18 h de incubação. A IL-33, por outro lado, tem sua produção maximizada logo após o estímulo inflamatório (LPS) e rapidamente cai, tornando-se quase indetectável pouco tempo após seu pico de produção (CAYROL *et al.* GIRARD, 2022). Existem poucos estudos explorando os mecanismos por trás da bioatividade de IL-33, porém, em Cohen *et al.* (2015), é discutida a possibilidade da bioatividade da IL-33 ser controlada pela rápida degradação que ela sofre após ser liberada para o meio extracelular, gerando uma queda abrupta em sua disponibilidade poucas horas após o estímulo inflamatório.

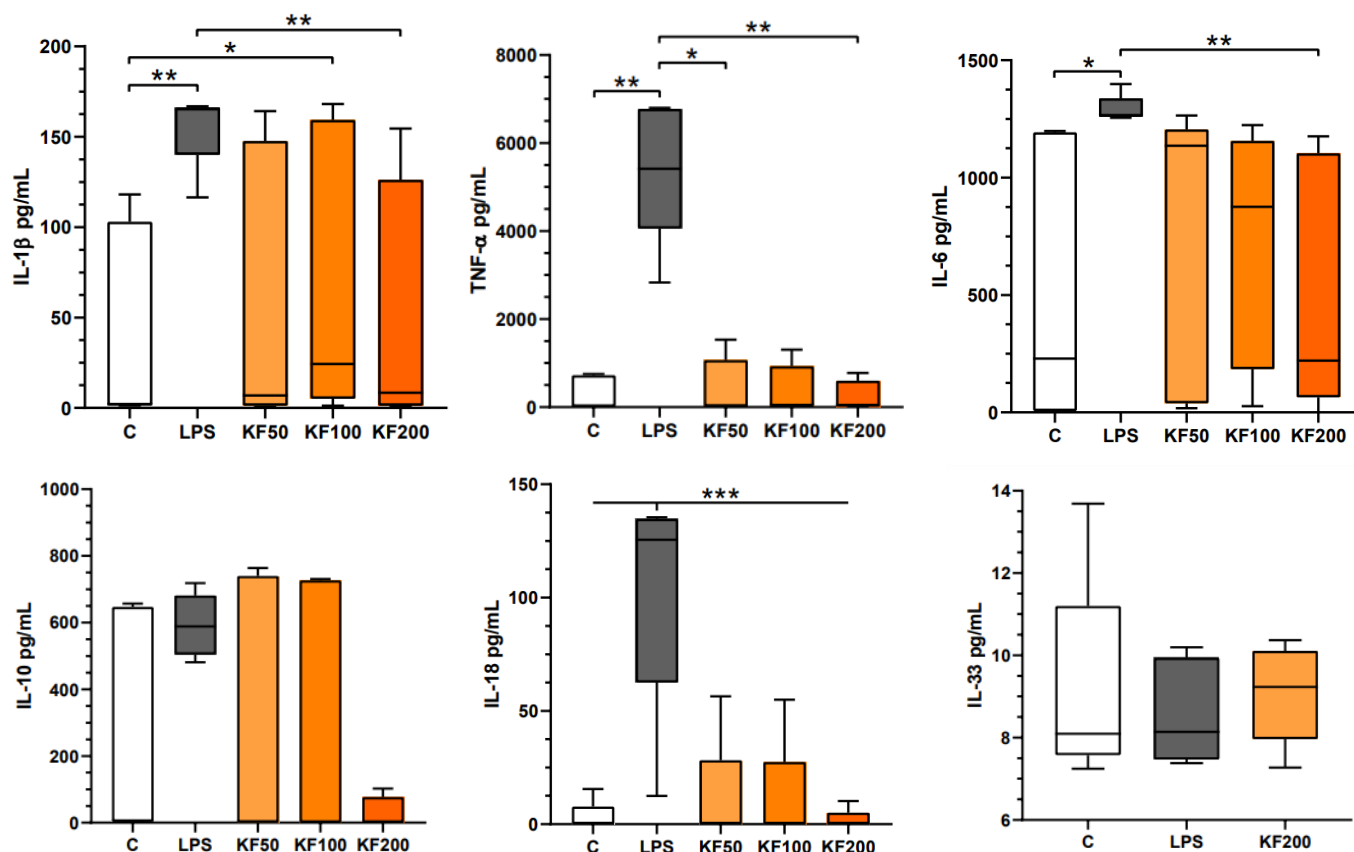


Figura 6: Produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos (1×10^6 células/mL) incubados com RPMI 1640 (controle - C), lipopolissacarídeo (LPS - 100ng/mL), ou após incubação por 18 h com canferide (KF -50, 100 e 200 μ M). Os dados estão representados em mediana e quartis (n = 5). * (P < 0,05), ** (P < 0,01), *** (P < 0,001).

Apesar da alta variabilidade observada, algumas diferenças significativas entre os tratamentos ou entre os tratamentos e os controles puderam ser detectadas nas outras citocinas analisadas. Na análise de IL-1 β , KF100 exerceu aumento significativo na produção da citocina, que é deflagradora de processos inflamatórios, indicando que KF na concentração de 100 μ M pode atuar modulando as células para este perfil. A KF200, contudo, exerceu o efeito contrário, se distanciando do controle positivo com a mesma significância que o controle negativo (p < 0.01). O mesmo aconteceu na análise de TNF- α e IL-6, nas quais KF200 também distanciou-se do controle positivo de forma semelhante ao controle negativo, indicando que canferide, na concentração de 200 μ M, não altera de maneira significativa o metabolismo celular basal.

Análise de citocinas com indução de quadro inflamatório

Diferenças significativas foram obtidas somente em duas das seis citocinas testadas, TNF- α e IL-10 (Fig. 7). Apesar disso é possível ver variações nas medianas dos tratamentos. Possivelmente mais diferenças estatísticas seriam detectadas caso o n experimental fosse maior.

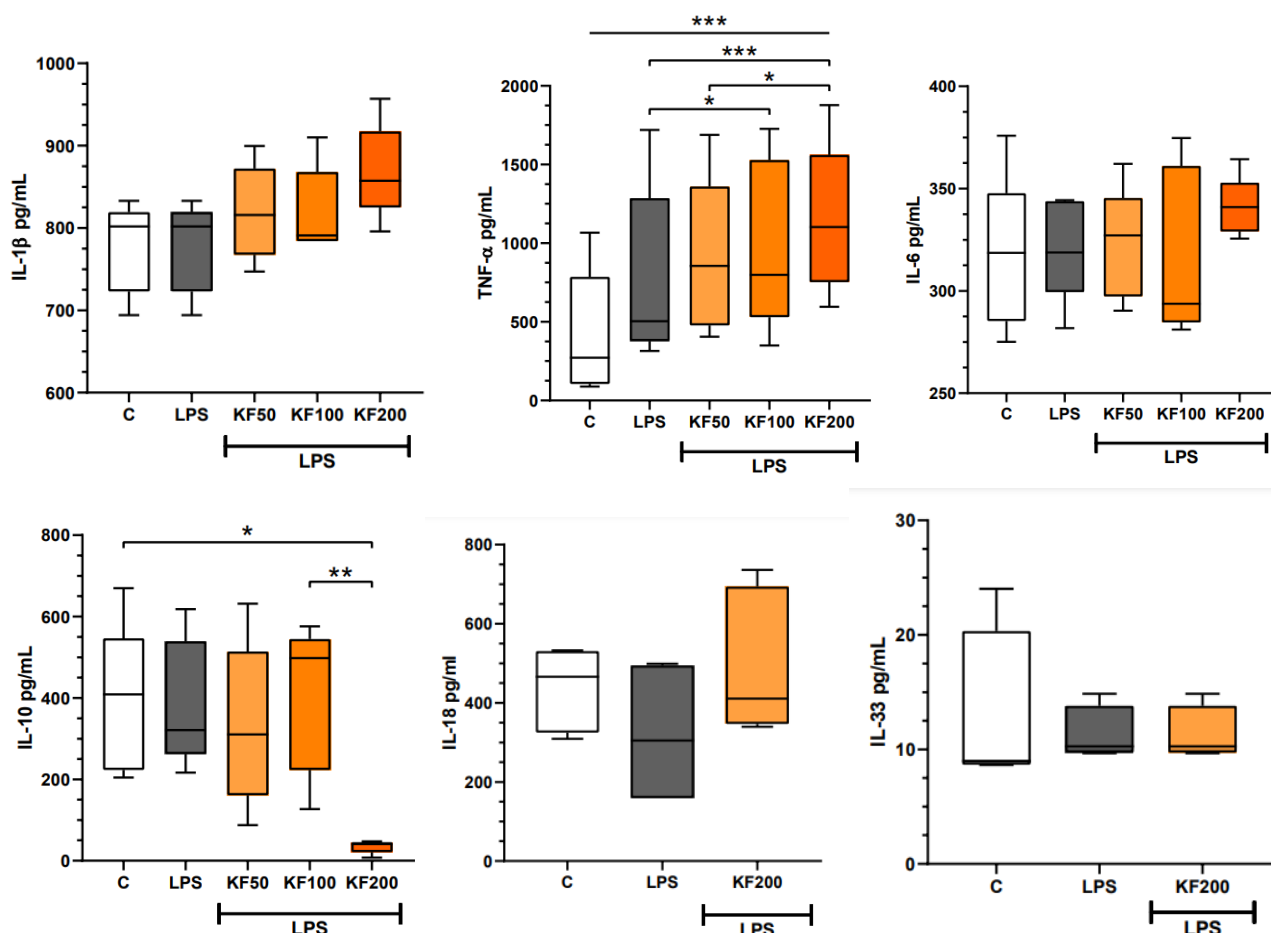


Figura 7: Produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 (pg/mL) por monócitos humanos (1×10^6 células/mL) incubados com RPMI 1640 (controle negativo – C), lipopolissacarídeo (LPS – 100ng/mL), ou após incubação com LPS (100 ng/ml) por 2 h seguido de incubação por 18 h com canferide (KF –50, 100 e 200 μ M). Os dados estão representados em mediana e quartis (n = 5). * (P < 0,05), ** (P < 0,01), *** (P < 0,001).

Contudo, os resultados obtidos sugerem que a canferide, na concentração de 200 μ M, modula os monócitos para que estes passem a exibir um perfil pró-inflamatório. Tal ação da canferide é evidenciada pela queda significativa de IL-10 em relação ao controle negativo após o tratamento. A IL-10 é responsável pelo controle do processo inflamatório, sendo uma peça-chave para a manutenção do equilíbrio entre a eliminação do agente causador da inflamação e a contenção dos possíveis efeitos indesejados da resposta-imune (e.g. dano aos tecidos no sítio de infecção) (ROJAS *et al.*, 2017). Estudos sugerem que a IL-10, antes pensada somente como uma citocina imunossupressora, pode também estimular a inflamação a depender das células com as quais ela está interagindo (OUYANG *et al.*, 2019; WILKE *et al.*, 2011). No caso de monócitos humanos, a ação da IL-10 é dada como imunossupressora, em razão do efeito

inibitório que exerce sobre as citocinas responsáveis pela deflagração e manutenção do processo inflamatório, como a IL-1 α e β , IL-6, IL-12, IL-18, e do TNF- α , além da grande parte das quimiocinas (CCL2, CCL12, CCL5, CXCL8, CXCL10 e CXCL2) (ARMSTRONG *et al.*, 1996; OUYANG *et O'GARRA*, 2019).

A inibição da produção de IL-10 pela canferide em 200 μ M, portanto, reflete-se na produção das citocinas inflamatórias, contribuindo para que estejam aumentadas, como foi observado na análise de TNF- α .

Quantificação de Derivados do Ácido Araquidônico

Não foram observadas diferenças significativas na produção de PGE2 e LTB4, contudo, na figura 8a é possível ver forte redução na produção de PGE2 quando estimulada por canferide, que possivelmente não foi significativa em razão do baixo n amostral utilizado (2). A PGE2 e suas isoformas são tradicionalmente reconhecidas pela capacidade imunoativadora que possuem, representada pelo poder de causar vasoconstrição, rubor e, especialmente dor, tornando-a um importante alvo de estudo (PARK *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2024). Apesar disso, estudos recentes apontam que a prostaglandina pode gerar diferentes tipos de resposta à depender do tipo celular e receptor com qual ela está interagindo (FOUDI *et al.*, 2012). Portanto, hoje a prostaglandina é descrita como uma mediadora da inflamação, atuando tanto na ativação da resposta inflamatória quanto em sua resolução.

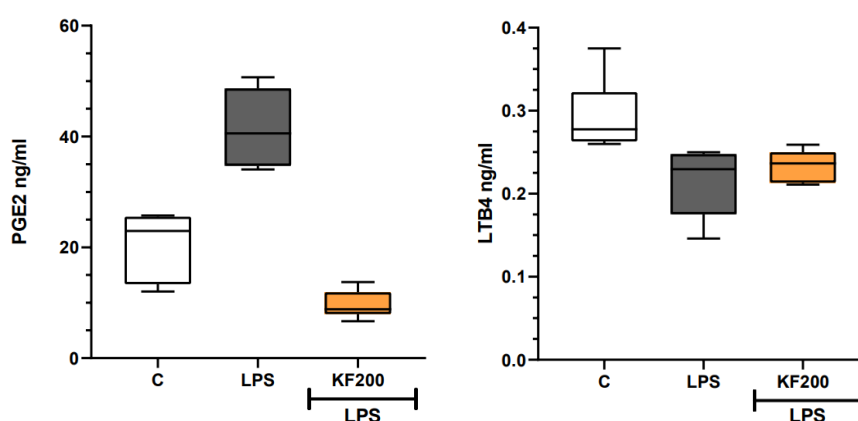


Figura 8: Produção de PGE2 e LTB4 por monócitos, em ng/mL.

Os resultados obtidos, apesar de não significantes, indicam uma tendência de redução da produção de prostaglandina E2 pela canferide, porém sem alterar o perfil pró-inflamatório demonstrado pela produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , que permaneceu alto em relação ao controle mesmo com a queda da prostaglandina, fenômeno observado em outros estudos (KUNKEL *et al.*, 1986; YANG *et al.*, 2024).

Não houveram mudanças significativas na produção na produção basal de leucotrieno B₄, indicando que a produção de citocinas pró-inflamatórias observado no tratamento com canferide não se dá pela interação das células com o leucotrieno. Porém o LPS, mesmo tendo sido utilizado na mesma concentração de outros trabalhos (RANKIN *et al.*, 1990), falhou em induzir a produção de LTB₄.

Expressão de receptores de membrana

Receptores de membrana são moléculas essenciais para o funcionamento do sistema imune, já que permitem a comunicação entre as células que o compõe e viabilizam a interação destas com outras moléculas ou patógenos, contribuindo para a deflagração da resposta imunológica. Entre suas principais funções estão a indução da sinalização intracelular, promoção da adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular e a internalização de moléculas e até de outras células (ABBAS *et al.*, 2023).

Os marcadores analisados neste trabalho (CD62L, CD80, HLA-DR, TLR2 e TLR4) possuem diversas funções que estão diretamente relacionadas à função dos monócitos como células circulantes responsáveis pela fagocitose e apresentação de antígenos, constituindo importantes indicadores. Não foram observadas mudanças significativas na expressão de nenhum dos receptores analisados após o tratamento dos monócitos por canferide, contudo, é possível notar algumas tendências que possivelmente não foram estatisticamente significantes devido ao número limitado de observações e da alta variabilidade entre os experimentos.

Os marcadores CD80, HLA-DR, TLR2 e TLR4 dos monócitos tratados por canferide aparecem aumentados, mesmo que sutilmente, dos controles analisados (**Fig. 9**). Isto condiz com a produção de citocinas observada, que indicou a prevalência de um perfil pró-inflamatório pelos monócitos tratados com canferide em concentração de 200 μ M. Tais marcadores são responsáveis, respectivamente, pela coestimulação da resposta imune adaptativa na interação de células apresentadoras de antígenos (APCs) com linfócitos T (SHARMA *et al.*, 2009), apresentação de antígenos a outras células efetoras do sistema imune adaptativo (PALOJÄRVI *et al.*, 2013), amplo reconhecimento de PAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados a patógenos e padrões moleculares associados a perigo) e reconhecimento de LPS (MEDZHITOV, 2001), ou seja, estão todos associados à deflagração do processo inflamatório e da resposta imune adaptativa.

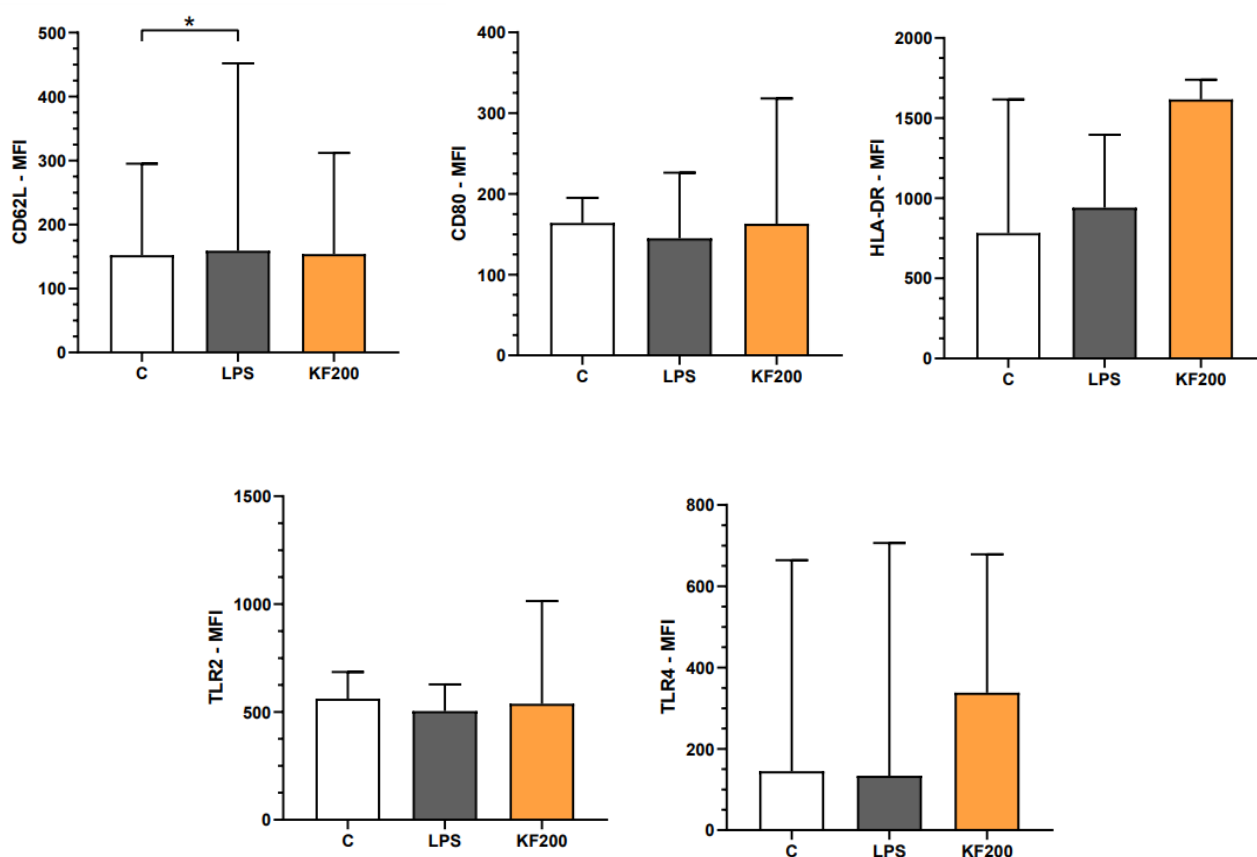


Figura 9: Média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD62L, CD80, HLA-DR, TLR-2 e TLR-4 em monócitos humanos. As colunas representam as medianas dos tratamentos e as barras de erro representam os valores dentro do intervalo de confiança (95%). *P < 0,05.

A expressão diferencial dos TLR2 e TLR4 na população de monócitos estudada também foi avaliada. Os resultados, apesar da alta variação, indicam um aumento de células TLR2+ TLR4-, assim como de células TLR2+ TLR4+ (**Fig. 10**). Não foram observadas mudanças na produção de células TLR4+. Estudos mostram que tanto TLR2 quanto TLR4 têm produção controlada pela ativação da via de sinalização NF- κ B (OZATO *et al.*, 2018; TAKEUCHI *et al.*,

1999), porém outros estudos mostram que monócitos CD14+ sob estímulo inflamatório expressam TLR2 em maior quantidade que os demais TLRs (SABROE *et al.*, 2002; FLO *et al.*, 2001).

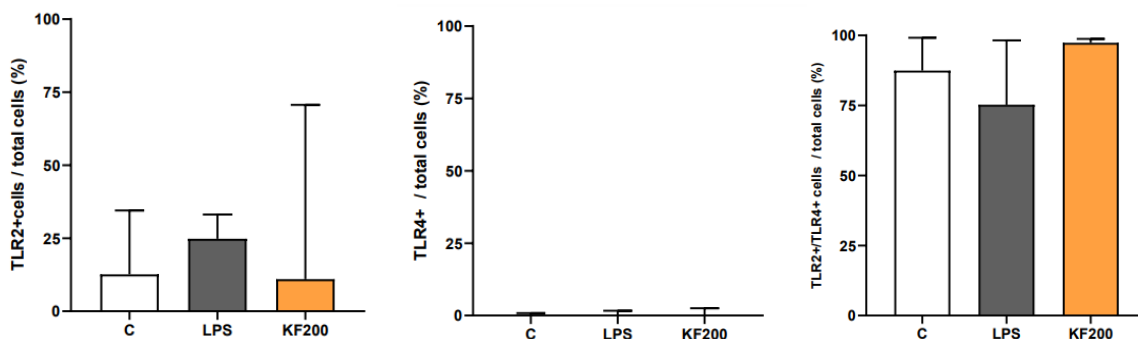


Figura 10: Percentual (%) de células expressando somente receptores TLR2 (a), TLR4 (b) e expressando ambos simultaneamente (c).

Atividade bactericida

Em concordância com a expressão aumentada de TNF- α e aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ver próxima seção), os monócitos estimulados por canferide apresentaram atividade bactericida superior ao controle negativo, embora não significativo estatisticamente (**Fig. 11**). Entretanto, embora não significativo, este aumento não pode ser descartado, pois biologicamente a canferide pode auxiliar os monócitos, ativando mecanismos relacionados à sua ação bactericida.

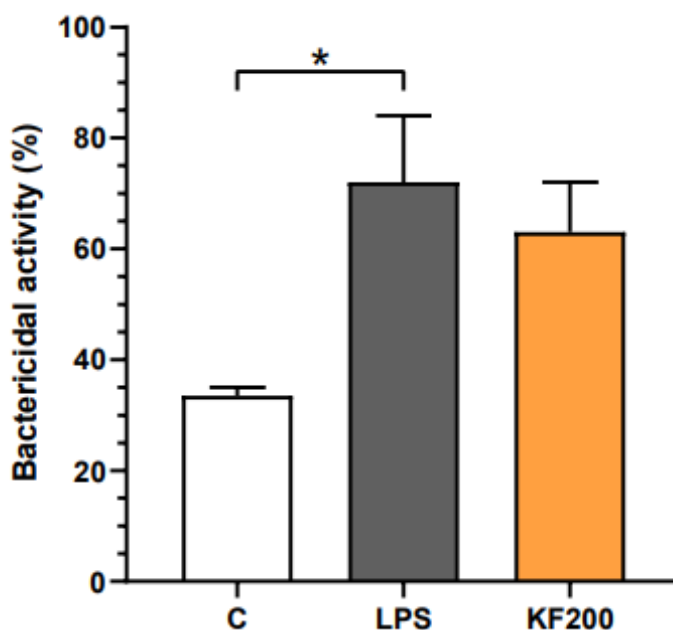


Figura 11: Atividade bactericida de monócitos tratados com RPMI 1640 (controle - C), LPS (100 ng/mL) ou canferide (200uM). *P < 0,05.

Estudos explorando a ação da canferide na atividade fagocítica de quaisquer tipos celulares ainda são escassos, tornando este um dos poucos estudos que aborda este perfil de

ação. É importante que mais estudos sejam produzidos envolvendo o ensaio de atividade bactericida, para que novas interpretações dos resultados aqui apresentados possam ser realizadas.

Produção de espécies reativas do oxigênio

As espécies reativas do oxigênio (EROs) são radicais, íons ou moléculas advindas da metabolização parcial do oxigênio, o que às confere grande potencial oxidativo. Apesar de produzidas naturalmente pelo sistema imunológico durante o processo inflamatório como poderosas armas para o combate de micro-organismos e regulação do inflamassoma (ROY *et al.*, 2017; DRYDEN, 2018), a produção em excesso ou crônica de EROs pode gerar danos teciduais, tornando-as parte da patologia de múltiplas doenças (LIOU *et al.*, 2014; MITTAL *et al.*, 2014).

A análise de EROs realizada neste trabalho revelou um sutil aumento na produção de EROs pelos monócitos após o tratamento com canferide (Fig. 12c), o que corrobora com a hipótese de que a canferide induz a expressão de um perfil ativador em monócitos.

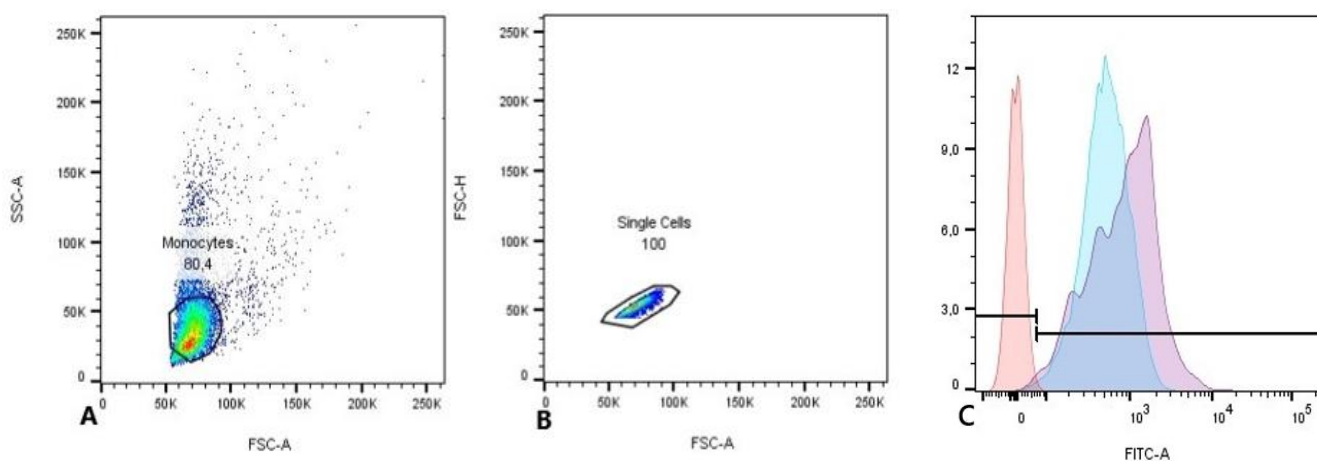


Figura 12: População de monócitos definida por tamanho e granulosidade (A), Determinação da passagem de singlets (B) e produção de EROs (C). Histograma da produção de EROs por células controle não-marcadas está em rosa salmão, células controle marcadas em azul e células tratadas por canferide em roxo.

Produtos naturais e seus derivados têm ganho cada vez mais espaço dentro da medicina ocidental como possíveis alvos farmacológicos e estudos *in vitro* são essenciais para permitir uma análise exploratória de seus efeitos. Ao reduzir a complexidade do sistema estudado, possíveis variáveis podem tornar-se negligenciáveis, permitindo definir interações específicas, que caracterizem relações de causa e efeito entre a substância analisada e a variação dos

parâmetros observados. Este estudo pôde, a partir dos resultados obtidos, dar um passo em direção à caracterização da ação imunomoduladora da canferide.

Não existem estudos utilizando a canferide em monócitos purificados, e os estudos até agora realizados com a canferide em outros tipos celulares descrevem-na como uma substância anti-inflamatória (SARTORI *et al.*, 2024; SONG *et al.*, 2024).

Portanto os achados aqui apresentados são inéditos dentro da literatura científica, destacando a necessidade de intensificar os estudos sobre estes novos, e ao mesmo tempo tradicionalmente utilizados, produtos com potencial terapêutico, a fim de expandir suas aplicações ao compreender a fundo seus diversos efeitos.

Conclusão

O aumento da disponibilidade de TNF- α , da expressão de receptores de membrana e da produção de EROs, concomitantemente com a drástica redução da IL-10, indica uma ação ativadora da canferide sobre os monócitos, ilustrada pela atividade bactericida observada.

Referências bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S.; BAKER, D. L. *Cellular and molecular immunology*. 10. ed. Elsevier, 2022.

AICKIN, M.; GENSLER, H. Adjusting for multiple testing when reporting research results: the Bonferroni vs Holm methods. *American Journal of Public Health*, v. 86, n. 5, p. 726-728, 1996. DOI: <https://doi.org/10.2105/ajph.86.5.726>.

ALENCAR, S. M. *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>.

ALVAREZ, C.; STAPE, J.; SENTELHAS, P.; GONÇALVES, J.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, p. 711-728, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.

ARMSTRONG, L.; JORDAN, N.; MILLAR, A. Interleukin 10 (IL-10) regulation of tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) from human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes. *Thorax*, v. 51, n. 2, p. 143-149, fev. 1996. DOI: 10.1136/thx.51.2.143. PMID: 8711645; PMCID: PMC473022.

BANKOVA, V. S. *et al.* Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>.

CARLINI, V. *et al.* The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1161067, jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161067>.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, v. 73, Suppl. 1, p. S1-S6, nov. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00185-5](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00185-5).

CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: Biological and Pharmacological Activities. *Therapeutic Uses of This Bee-product. Annual Review of Biomedical Sciences*, v. 3, p. 49-66, 2001. DOI: <https://doi.org/10.5016/1806-8774.2001v3p49>.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine. *Cytokine*, [S.l.], v. 156, p. 155891, ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155891>.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.

CONOVER, W. J. *Practical Nonparametric Statistics*. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

CRANE, E. *The past and present importance of bee products to man*. New York: Plenum Press, 1997.

DA SILVA, J. M.; LACHER, T. Caatinga—South America. In: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11984-0>. 2019.

DEZMIREAN, D. S. *et al.* Plant Sources Responsible for the Chemical Composition and Main Bioactive Properties of Poplar-Type Propolis. *Plants (Basel)*, v. 10, n. 1, p. 22, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10010022>.

DIOSCORIDES PEDANIUS, O. A. A.; LAGUNA, A. D. (1555) *De Materia Medica* by Dioscorides. Antwerp: Jean Laet. [Pdf] Retrieved from the Library of Congress, <https://www.loc.gov/item/2021666851/>.

DOMÍNGUEZ-ANDRÉS, J.; NETEA, M. G. Impact of Historic Migrations and Evolutionary Processes on Human Immunity. *Trends in Immunology*, v. 40, n. 12, p. 1105-1119, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.10.001>.

DRYDEN, M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 51, n. 3, p. 299–303, mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.08.029>.

FLO, T. H.; HALAAS, O.; TORP, S.; RYAN, L.; LIEN, E.; DYBDAHL, B.; SUNDAN, A.; ESPEVIK, T. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 69, n. 3, p. 474–481, mar. 2001.

FOUDI, Nabil; GOMEZ, Ingrid; BENYAHIA, Chabha; LONGROIS, Dan; NOREL, Xavier. Prostaglandin E2 receptor subtypes in human blood and vascular cells. *European Journal of Pharmacology*, [S.l.], v. 695, n. 1-3, p. 1–6, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.08.009>.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, v. 14, n. 6, p. 392-404, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3671>.

HASHIMOTO, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, v. 38, n. 4, p. 792-804, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>.

IMHOF, B. A.; AURRAND-LIONS, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 6, p. 432-444, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1375>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity*. 2009.

- JAFFARI, M.; ANSARI-POUR, N. Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell Journal*, v. 20, n. 4, p. 604-607, 2019. DOI: <https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5992>.
- JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 6, p. 349-362, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.28>.
- KAPELLOS, T. S. *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 2035, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>.
- KRZYWINSKI, M.; ALTMAN, N. Comparing samples—part II. *Nature Methods*, v. 11, p. 355-356, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2900>.
- KUNKEL, S. L.; SPENGLER, M.; MAY, M. A.; SPENGLER, R.; LARRICK, J.; REMICK, D. Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 11, p. 5380–5384, 15 abr. 1988.
- KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2013, p. 964149, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/964149>.
- LEE, E.-J. *et al.* Effects of Hydroxy and Methoxy Substituents on NMR Data in Flavonols. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 29, p. 507-512, 2008. DOI: <https://doi.org/10.5012/bkcs.2008.29.2.507>.
- LIBBY, P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition Reviews*, v. 65, n. 12 Pt 2, p. S140-S146, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x>.
- LIU, G. Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, v. 44, n. 5, p. 479–496, maio 2010. DOI: <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>.
- LYNDY, J. M. *et al.* Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. In: KUETE, V. (Ed.). *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2014. p. 181-233. ISBN 9780128000182. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00008-X>.

MARSHALL, J. S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clinical Immunology*, v. 14, n. Suppl. 2, p. 49, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.

MEDRANO-BOSCH, M. *et al.* Monocyte-endothelial cell interactions in vascular and tissue remodeling. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1196033, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1196033>.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 1, n. 2, p. 135–145, nov. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/35100529>.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 1 mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.

NEMENYI, P. B. *Distribution-free multiple comparisons*. 1963. Tese (Doutorado) — Princeton University, New Jersey, 1963.

NIKITA, Efthymia. *Statistical methods in human osteology*. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804021-8.00009-7>.

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, v. 50, n. 4, p. 871-891, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>. PMID: 30995504.

OZATO, K.; TSUJIMURA, H.; TAMURA, T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *BioTechniques*, v. 33, n. sup4, p. S66–S75, 2002. DOI: <https://doi.org/10.2144/Oct0208>.

PEREIRA, D.; AFONSO, A.; MEDEIROS, F. Overview of Friedman's Test and Post-hoc Analysis. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, v. 44, p. 2636-2653, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/03610918.2014.931971>.

PALOJÄRVI, A.; PETÄJÄ, J.; SIITONEN, S. *et al.* Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. *Pediatric Research*, v. 73, p. 469–475, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/pr.2012.199>.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology*, v. 119, n. 3, p. 229–240, jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.01.016>.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf011432b>.

RANKIN, J. A.; SYLVESTER, I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T.; LEONARD, E. J. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *Journal of Clinical Investigation*, [S.l.], v. 86, n. 5, p. 1556–1564, nov. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI114875>.

REDDIN, I. G. *et al.* Large inherent variability in data derived from highly standardized cell culture experiments. *Pharmacological Research*, v. 188, p. 106671, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106671>.

ROJAS, José M.; AVIA, Miguel; MARTÍN, Verónica; SEVILLA, Noemí. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *Journal of Immunology Research*, v. 2017, p. 6104054, 14 p., 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/6104054>.

ROY, Jérôme; GALANO, Jean-Marie; DURAND, Thierry; LE GUENNEC, Jean-Yves; LEE, Chung-Yung; JETTY, Jetty. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *FASEB Journal*, v. 31, p. 3729–3745, 2017.

SABROE, Ian; JONES, Elizabeth C.; USHER, Lynne R.; WHYTE, Moira K. B.; DOWER, Steven K. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *Journal of Immunology*, v. 168, n. 9, p. 4701–4710, 1 maio 2002. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4701>.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? *Apidologie*, v. 52, n. 6, p. 1075-1097, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00889-z>.

SALATINO, A. *et al.* Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/ecam/neh060>.

SALEZ, L.; SINGER, M.; BALLOY, V.; CRÉMINON, C.; CHIGNARD, M. Lack of IL-10 synthesis by murine alveolar macrophages upon lipopolysaccharide exposure. Comparison

with peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 67, n. 4, p. 545–552, abr. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.67.4.545>.

SANTIAGO, K. B. *et al.* Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. 8, p. ftw081, 2016. DOI:(<https://doi.org/10.1093/femspd/ftw081>).

SARTORI, A. A.; SON, N. T.; HONORIO, M. da S.; RIPARI, N.; SANTIAGO, K. B.; GOMES, A. M.; ZAMBUZZI, W. F.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Effects of caatinga propolis from *Mimosa tenuiflora* and its constituents (santin, sakuranetin and kaempferide) on human immune cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 319, p. 117297, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117297>.

SFORCIN J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res.* 2016 Jun;30(6):894-905. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>. Epub 2016 Mar 14.

SFORCIN J.M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;113(1):1-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>.

SHARMA, Anurag; LI, Xiaoxin; BANGARI, Dinesh S.; MITTAL, Suresh K. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Research*, [S.l.], v. 143, n. 2, p. 184–194, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.02.010>.

SILVA AC, SOUZA AF. Aridity drives plant biogeographical sub regions in the Caatinga, the largest tropical dry forest and woodland block in South America. *PLoS One*. 2018 Apr 27;13(4):e0196130. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196130>.

SILVA, J. G.; SAAD, M. H. F.; ROCHA, L. A. C. Chemical Composition of the Brazilian Propolis from the Southern Region and Its Biological Properties. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 510, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00510>.

SILVA-CARVALHO R, BALTAZAR F, ALMEIDA-AGUIAR C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:206439. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/206439>. Epub 2015 May 27.

SON, Ninh The; RIBEIRO, Victor Pena; BASTOS, Jairo Kenupp. Flavonoids from green propolis of the Northeastern Brazilian Caatinga *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.: A chemotaxonomic aspect. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 104, p. 104473, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2022.104473>.

SONG, B.; NIU, W.; ZHANG, S.; HAO, M.; LI, Y.; CHEN, Q.; LI, S.; TONG, C. A mechanistic review of the pharmacological aspects of Kaempferide as a natural compound. *Heliyon*, v. 10, n. 19, p. e38243, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38243>.

SOUZA, D. S.; RODRIGUES, T. E. Y.; ALVES, J. E. P. Quantification and Evaluation of Biological Properties of Propolis from the Amazon. *Molecules*, v. 24, n. 14, p. 2659, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24142659>.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T.; SANJO, H.; TAKADA, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, v. 11, n. 4, p. 443–451, out. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80119-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80119-3).

TER HORST, R. *et al.* Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell*, v. 167, n. 4, p. 1111-1124.e13, nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.018>.

WILKE, C. M.; WEI, S.; WANG, L.; *et al.* Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 60, p. 1529–1541, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1104-5>.

YANG, Dinglong; XU, Ke; XU, Xin; XU, Peng. Revisiting prostaglandin E2: A promising therapeutic target for osteoarthritis. *Clinical Immunology*, v. 260, p. 109904, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2024.109904>.

YU, Z. *et al.* Beyond t test and ANOVA: applications of mixed-effects models for more rigorous statistical analysis in neuroscience research. *Neuron*, v. 110, n. 1, p. 21-35, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.030>. Epub 2021 Nov 15.

ZHU, J. *et al.* Classifying monocytes and macrophages in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 23, n. 4, p. 308-323, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00799-3>.