UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu
PG-BGA

ARTHUR ALVES SARTORI

AÇÃO IMUNOMODULADORA DE CONSTITUINTES ISOLADOS DA PRÓPOLIS DE JUREMA-PRETA (*Mimosa tenuiflora*) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

BOTUCATU-SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu
PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AÇÃO IMUNOMODULADORA DE CONSTITUINTES ISOLADOS DA PRÓPOLIS DE JUREMA-PRETA (*Mimosa tenuiflora*) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

ARTHUR ALVES SARTORI

ORIENTADOR: PROF. TITULAR JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

CO-ORIENTADORA: DRA. KARINA BASSO SANTIAGO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas – Estrutura e Função

Orientador: Prof. Titular José Maurício Sforcin

BOTUCATU-SP

2023

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sartori, Arthur Alves.
Ação imunomoduladora de constituintes isolados da própolis de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) em células mononucleares do sangue periférico / Arthur Alves Sartori. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: José Maurício Sforcin
Coorientador: Karina Basso Santiago
Capes: 21100004

1. Própole. 2. Inflamação. 3. Leucócitos mononucleares. 4. Imunomodulação.

Palavras-chave: Compostos isolados; Imunomodulação; Inflamação; Leucócitos mononucleares; Própolis.

Agradecimentos

Aos meus pais, Francisco e Maria Lucia, por sempre darem tanto valor ao estudo e ao respeito. A cada passo que dou eu torço pra que eu esteja honrando todos seus ensinamentos e apoio.

Ao meu irmão, Marcos Vinicius, pela amizade, incentivo e amparo. Gostaria que você soubesse o quão grato sou pelo sentimento de poder contar com você.

Ao meu orientador e, cada dia mais, amigo, José Maurício Sforcin. É incrível ter um orientador que admiro não apenas profissionalmente, mas muito, também, como pessoa. Obrigado por cada conselho que tem me ajudado a crescer tanto enquanto trilho esse caminho.

À minha co-orientadora, Dra. Karina Basso Santiago, por tudo que aprendi ao longo desses anos. Fico muito feliz de ter acompanhado um de seus sonhos se realizarem, torço muito pra que todos os outros também se realizem.

A todos que convivi no Laboratório de Imunomodulação por Produtos Naturais desde minha primeira iniciação científica, mas em especial aos atuais colegas com os quais dividi todos os dias do meu mestrado, Nicolas e Mariana, por todo trabalho, companheirismo, discussões científicas e momentos de descontração na rotina do laboratório.

Aos meus colegas de casa, Beatriz, Marina e Gustavo, pela convivência diária repleta de desabafos e risadas.

À república Nutritivas, por serem minha família em Botucatu, por me amarem e me acolherem. Vocês estão em grande parte dos melhores momentos que vivi nessa cidade, desde as festas até as tardes de filme mais ternas. Eu amo muito cada uma de vocês.

Aos meus amigos Maria Laura, Giovana, Sávio e Carol, e ao meu parceiro Rafael, eu me sinto sortudo todos os dias por poder compartilhar a vida com vocês.

A todos os docentes, discentes e funcionários do Setor de Microbiologia e Imunologia, por todo auxílio e pelas conversas durante os cafés na copa.

Ao Prof. Titular Jairo Kenupp Bastos, pela concessão das amostras utilizadas neste trabalho e pela parceria no Projeto Temático da FAPESP (2017/04138-8).

Ao Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi e ao Me. Anderson Moreira Gomes, pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Mestrado (2021-2023) concedida para execução deste projeto.

“Se na bandeira resta algum coração,
quando ele pulsa, ela sangra vermelha”

PITTY

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Nome por extenso	Nome em inglês
CLR	Receptores de Lectina tipo C	C-type Lectin Receptor
COX	Cicloxigenase	Cyclooxygenase
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Danos	Damage-associated Molecular Patterns
DEXA	Dexametasona	Dexamethasone
DMT	Dimetiltriptamina	N,N-dimethyltryptamine
DSMO	Dimetilsulfóxido	Dimethylsulfoxide
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Quinase Regulada por Fatores Extracelulares	Extracellular Signal-regulated Kinase
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Detecção por Arranjo de Diodos	High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector
IκB	Proteína Inibitória κB	κB Inhibitory Protein
IKK	Proteína Quinase de IκB	IκB Kinase Protein
IL	Interleucina	Interlekin
JNK	C-Jun N-terminal Quinase	C-jun N-terminal Kinase
KF	Canferide	Kaempferide
LPS	Lipopolissacarídeo	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotrieno B4	Leukotriene B4
MAPK	Proetína Quinase Ativada por Mitógeno	Mitogen-activated Protein Kinase
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade	Major Histocompatibility Complex
MTT	3-(4,5 Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazolina	3-(4,5-Dimetylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

NF-Kβ	Fator Nuclear Kappa B	Nuclear Fator Kappa B
NLR	Receptores do tipo NOD	NOD-like Receptor
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos	Pathogen-associated Molecular Pattern
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Salina tamponada com fosfato	Phosphate buffered saline
PGE2	Prostaglandina E2	Prostaglandin E2
PM	Própolis de *Mimosa tenuiflora*	*Mimosa tenuiflora* Propolis
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrões	Pattern Recognition Receptor
RLR	Receptores do tipo RIG-I	RIG-I-like Receptor
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
SK	Sakuranetina	Sakuranetin
ST	Santin	Santin
TLR	Receptor do tipo Toll	Toll-like Receptor
TMB	3,3’,5,5’ Tetrametilbenzidina	3,3’,5,5’-Tetrametilbenzidine
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa	Tumor Necrosis Factor Alpha

RESUMO

Inflamação é um conjunto de eventos vasculares, moleculares e atividade celular desencadeado por estímulos nocivos. Caso não seja devidamente controlada, a cascata de eventos inflamatórios pode levar ao desenvolvimento de diversas condições patológicas. Diferentes intervenções terapêuticas têm sido utilizadas para o controle e tratamento de doenças inflamatórias, mas o uso prolongado de anti-inflamatórios glicocorticoides como a dexametasona pode ocasionar efeitos colaterais como imunossupressão. Assim, o interesse por novas estratégias para o tratamento de doenças inflamatórias, como o uso de produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias tem sido crescente. A própolis é um produto apícola com diversas atividades biológicas. Recentemente, está sendo investigada uma nova amostra de própolis produzida na caatinga nordestina, tendo como fonte vegetal predominante a *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. O presente trabalho foi delineado visando avaliar o potencial efeito imunomodulador do extrato de própolis de *M. tenuiflora* e de três de seus constituintes isolados (*santin*, *sakuranetin* e *kaempferide*) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Foi avaliada a viabilidade celular e produção de citocinas (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10) de PBMCs estimuladas previamente ou não com LPS. Também foi analisada a produção de metabólitos do ácido araquidônico (PGE2 e LTB4), e vias intracelulares (NF- κB e p38 MAPK). Apenas as maiores concentrações de própolis afetaram a viabilidade celular. Em condições basais, *santin* estimulou a produção de citocinas, enquanto *kaempferide* apresentou perfil inibitório. Todos os tratamentos reduziram a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pelo LPS, mas apresentaram perfis diferentes em relação à produção da citocina anti-inflamatória estudada (IL-10). Nenhum dos tratamentos, nem mesmo o LPS, afetou a produção de PGE2 e LTB4, o que pode não ter sido devidamente detectado. A expressão gênica de vias intracelulares não apresentou resultados conclusivos. Nossos dados evidenciam a ação imunomoduladora da própolis de jurema-preta e seus compostos isolados sobre PBMCs, especialmente a ação anti-inflamatória de todos os tratamentos estudados após ativação das culturas celulares com LPS. Este trabalho abre perspectivas para novos estudos junto a esta linha de pesquisa e fornece subsídios para a elaboração de novos fármacos e abordagens terapêuticas incluindo os constituintes isolados desta amostra de própolis da caatinga.

Palavras-chave: própolis; PBMC; inflamação; imunomodulação.

ABSTRACT

Inflammation is a set of vascular, molecular events and cellular activity triggered by harmful stimuli. If not properly controlled, the cascade of inflammatory events can lead to the development of various pathological conditions. Several therapeutic interventions have been used for controlling and treating inflammatory diseases, but the prolonged use of glucocorticoid anti-inflammatory drugs such as dexamethasone can cause side effects including immunosuppression. Thus, interest in new strategies for the treatment of inflammatory diseases, such as the use of natural products with anti-inflammatory properties, has increased. Propolis is a bee product with several biological activities. Recently, a new sample of propolis produced in the northeastern "caatinga" with *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir as the predominant vegetable source is being investigated. The present work was designed to evaluate the potential immunomodulatory effect of *M. tenuiflora* propolis extract and three isolated constituents (santin, sakuranetin and kaempferide) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Cell viability and cytokine production (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 and IL-10) of PBMCs stimulated previously or not with LPS were evaluated. The production of arachidonic acid metabolites (PGE2 and LTB4) and intracellular pathways (NF-κB and p38 MAPK) were also analyzed. Only the highest concentrations of propolis affected cell viability. In basal conditions, santin stimulated cytokine production, while kaempferide showed an inhibitory profile. All treatments reduced the production of pro-inflammatory cytokines induced by LPS, showing different profiles regarding the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. None of the treatments, not even LPS, affected PGE2 and LTB4 production, which may not have been properly detected. The gene expression of intracellular pathways did not show conclusive outcomes. Our data showed the immunomodulatory action of "jurema-preta" propolis and its isolated compounds on PBMCs, especially the anti-inflammatory action of all treatments after activation of cell cultures with LPS. This work opens perspectives for new studies along this line of research and provides subsidies for the development of new drugs and therapeutic approaches including the isolated constituents of this sample of "caatinga" propolis.

Keywords: propolis; PBMC; inflammation; immunomodulation.

Sumário

1. Introdução 11
2. Objetivos 20
3. Material e Métodos 21
3.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis e isolamento de seus constituintes 21
3.2. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico e condições experimentais 21
3.3. Avaliação da viabilidade celular por MTT 22
3.4. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA 22
3.5. Determinação de prostaglandina E2 e leucotrieno B4 23
3.6. Expressão gênica do NF-κB e p38 MAPK por RT-qPCR 23
3.7. Análise estatística 24
4. Resultados 25
4.1. Viabilidade celular 25
4.2. Produção de citocinas 25
4.3. Produção de eicosanoides 31
4.4. Avaliação de vias intracelulares 31
5. Discussão 32
6. Conclusões 40
7. Referências bibliográficas 41
Anexo 1 49

1. Introdução

Inflamação é um conjunto de eventos vasculares, moleculares e atividade celular desencadeado por estímulos prejudiciais ao organismo, como infecções e lesões teciduais (ARULSELVAN *et al.*, 2016). A inflamação é uma resposta adaptativa do sistema imune visando a restauração da homeostase tecidual, a remoção do estímulo nocivo e o processo de reparo. É, portanto, um mecanismo de defesa essencial para a saúde do organismo (CHEN *et al.*, 2018).

Quatro sinais cardinais da inflamação foram inicialmente descritos, sendo eles calor, rubor, edema e dor. Posteriormente, um quinto sinal foi adicionado: a limitação funcional. Esses sinais cardinais podem ser explicados pelos eventos que ocorrem durante o processo inflamatório: vasodilatação, mudança da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento de fluidos, influxo de leucócitos, metabolismo celular elevado e liberação de mediadores inflamatórios (FERRERO-MILIANI *et al.*, 2007).

Pode-se pensar que uma resposta inflamatória controlada é benéfica (por exemplo, ao oferecer proteção contra uma infecção), mas há uma linha tênue entre os efeitos positivos e seu potencial para destruição tecidual a longo prazo. Caso não seja apropriadamente controlada ou resolvida, a cascata de eventos inflamatórios pode levar ao desenvolvimento de diversas condições patológicas como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, psoríase e câncer (SIMMONS, 2006). De acordo com vários fatores imunológicos e a duração do processo, a inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica.

A inflamação aguda é um processo rápido que dura minutos a poucos dias. A resposta é iniciada a partir do reconhecimento de agentes infecciosos ou causadores de lesão tecidual, seguido de ativação de receptores de células envolvidas na imunidade inata. Este reconhecimento é realizado principalmente por macrófagos e mastócitos residentes do tecido e desencadeia a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, eicosanoides, aminas vasoativas e produtos de cascatas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008). Os primeiros efeitos destes mediadores são alterações no fluxo vascular para a área inflamada, seguido de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, levando ao principal objetivo da inflamação aguda: a exsudação de plasma e migração de leucócitos (principalmente neutrófilos) para o local da infecção ou lesão (MARKIEWSKI & LAMBRIS, 2007).

Quando alcançam o sítio inflamatório, os neutrófilos são ativados tanto por citocinas secretadas pelas células residentes do tecido, quanto por contato direto com os patógenos. Os neutrófilos então liberam o conteúdo tóxico de seus grânulos na tentativa de eliminar o agente invasor, porém, é inevitável que estas substâncias também danifiquem o tecido do hospedeiro (NATHAN, 2006). Em uma resposta inflamatória aguda bem sucedida, após a eliminação da infecção, inicia-se o processo de resolução da inflamação e reparação tecidual (SERHAN & SAVILL, 2005). Quando este desfecho não é alcançado e o processo inflamatório persiste, a inflamação pode intensificar e tornar-se crônica.

A não eliminação de agentes infecciosos é a causa mais frequente de inflamação crônica, porém diversos outros quadros como exposição química prolongada, permanência de um corpo estranho no organismo, inflamações agudas recorrentes e suscetibilidade genética também podem levar ao desenvolvimento de inflamações crônicas (FERGUSON, 2010). Os processos celulares e moleculares envolvidos na inflamação crônica variam de acordo com o indutor inflamatório e o órgão acometido, podendo resultar em diferentes tipos de remodelação tecidual ou em doenças crônicas. Como resultado da inflamação persistente das vias aéreas induzida por alérgenos, a remodelação do tecido epitelial respiratório pode comprometer parcialmente o órgão culminando no desenvolvimento de asma (MEDZHITOV, 2010; ARULSELVAN *et al.*, 2016).

Por mais variadas e complexas que as respostas inflamatórias possam ser, todas compartilham um caminho em comum, que envolve o reconhecimento de estímulos prejudiciais por receptores de superfície celular, a ativação de vias inflamatórias, a liberação de mediadores inflamatórios e o recrutamento de células inflamatórias (CHEN *et al.*, 2018).

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são os responsáveis em detectar a presença de microrganismos, o que é realizado pelo reconhecimento de estruturas conservadas nas diferentes espécies de patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (GUDKOV & KOMAROVA, 2016). Os PAMPs incluem uma ampla gama de componentes como lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteínas e ácidos nucleicos (YAMAMOTO & TAKEDA, 2010) encontrados em bactérias Gram-positivas e negativas, vírus de DNA ou RNA, fungos e protozoários (OSPELT & GAY, 2010). Além dos PAMPs, os PRRs também reconhecem diversos sinais endógenos liberados durante danos celulares ou teciduais, denominados padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que podem ser liberados por células lisadas, iniciando uma resposta inflamatória mesmo na ausência de patógenos, conhecida como inflamação “estéril” (TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

Os PRRs são expressos tanto em células imunes, como macrófagos e células dendríticas, quanto em células não especializadas que também contribuem na imunidade inata, como células epiteliais e fibroblastos. Os PRRs compreendem várias famílias como os receptores do tipo NOD (NLRs), os receptores do tipo RIG-I (RLRs), os receptores de lectina tipo C (CLRs) e os receptores do tipo Toll (TLRs), sendo estes últimos a classe de PRRs mais estudada (TAKEUCHI & AKIRA, 2010; YAMAMOTO & TAKEDA, 2010). A interação de estímulos inflamatórios com PRRs desencadeia vias de sinalização intracelulares que levam à translocação de fatores de transcrição ao núcleo (CHEN *et al.*, 2018).

O fator de transcrição NF-κB consiste em uma família de cinco proteínas: NF-κB1 (p50), NF-κB2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel. Estas proteínas se organizam em diferentes homo- ou heterodímeros e mediam a transcrição de diversos genes ao se ligarem em regiões específicas do DNA (HOFFMANN *et al.*, 2006). Em condições fisiológicas, proteínas inibitórias κB (IκB) se ligam ao NF-κB, impedindo sua ligação ao DNA e acúmulo no núcleo. Na via canônica do NF-κB, a ativação de PRRs induz uma cascata de sinais intracelulares que culmina na fosforilação e degradação das proteínas IκB, mediada pelo complexo enzimático IκB quinase (IKK). Tal degradação resulta em translocações nucleares rápidas e transitórias de membros do NF-κB, principalmente os dímeros p50/RelA e p50/c-Rel, que ativam a transcrição gênica de diversas citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (LIU *et al.*, 2017).

Outra via que pode ser desencadeada por PRRs estimulados é a cascata das proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPK). As MAPKs são serina/treonina quinases que desempenham papel importante na regulação de diversos eventos celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência/apoptose, produção de citocinas e inflamação (PLATANIAS, 2003). Cada eixo de sinalização de MAPKs compreende pelo menos três componentes: uma MAP3K, uma MAP2K e uma MAPK. As MAP3Ks fosforilam e ativam MAP2Ks, que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs. Estas, por sua vez, fosforilam e ativam diferentes fatores de transcrição presentes no citoplasma, resultando em maior expressão gênica de mediadores envolvidos na resposta inflamatória (KAMINSKA, 2005; KIM & CHOI, 2010).

Há três principais grupos de MAPKs reguladas distintamente e que induzem diferentes expressões gênicas: ERK1/2, JNK e p38 MAPK. A p38 MAPK tem como principal resposta biológica a produção de mediadores inflamatórios e recrutamento de leucócitos. Muitos dos mRNAs que codificam genes de resposta inflamatória são instáveis e estabilizados pela via da p38 MAPK (KAMINSKA, 2005). Devido ao seu importante papel na inflamação crônica,

muitos estudos têm sido realizados envolvendo a aplicação de inibidores da p38 MAPK em doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e asma (LEE & KIM, 2017).

A inflamação é regulada por diversos mediadores incluindo citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e proteínas do sistema complemento. As citocinas são proteínas solúveis liberadas predominantemente por células imunes, sendo capazes de alterar o comportamento e propriedades de diferentes tipos celulares, participando dos processos inflamatórios por meio de uma complexa rede de interações, tendo em vista que diferentes citocinas podem apresentar funções sobrepostas e muitas regulam a produção de outras citocinas (DE JAGER *et al.*, 2003).

As citocinas podem apresentar caráter pró- ou anti-inflamatório, estimulando ou atenuando a resposta inflamatória, respectivamente. As principais citocinas pró-inflamatórias incluem a interleucina (IL)-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), todas reconhecidas por receptores de citocinas tipo I. Em contraste, a principal quimiocina pró-inflamatória, a IL-8, sinaliza via receptores acoplados à proteína G (TURNER *et al.*, 2014). Estas citocinas apresentam diversas funções como induzir a proliferação celular, apoptose e produção de outras citocinas e quimiocinas que resultam em um perfil inflamatório; contudo, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode levar a diversas consequências, desde danos teciduais até falência de órgãos e morte do indivíduo (CHEN *et al.*, 2018). Já a IL-10 apresenta propriedades anti-inflamatórias como a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e limitação da resposta imune a patógenos, prevenindo doenças autoimunes e evitando níveis exacerbados da resposta inflamatória (SARAIVA & O'GARRA, 2010).

Além das citocinas, mediadores lipídicos como os eicosanoides também são responsáveis por diversos processos biológicos, especialmente na resposta inflamatória. Os eicosanoides derivam do ácido araquidônico, um ácido graxo poli-insaturado ligado a fosfolipídios de membranas celulares. Após ativação celular, o ácido araquidônico é liberado por ação de fosfolipases, sendo então metabolizado para formar eicosanoides pela ação de ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que geram prostaglandinas e tromboxanos, ou por lipoxigenases, gerando leucotrienos e lipoxinas (MEDZHITOV, 2008).

Os prostanoides, metabólitos do ácido araquidônico gerados pela via das ciclooxigenases, são os mediadores lipídicos mais conhecidos. Dentre eles, a prostaglandina E2 (PGE2), a mais estudada das prostaglandinas, é produzida em condições fisiológicas, mas tem sua produção aumentada em situações de inflamação e atua na regulação da temperatura corporal, integridade da mucosa gástrica, fluxo sanguíneo renal, dentre outros processos fisiológicos (AZAB *et al.*, 2016). A PGE2 também apresenta grande impacto no

processamento de sinais de dor e, em excesso, pode ser responsável por diversos distúrbios relacionados à inflamação (KAWABATA, 2011; FAUDZI *et al.*, 2020).

Os leucotrienos são produzidos pela ação das lipoxigenases e são mediadores lipídicos envolvidos nas respostas imunes, na inflamação e em diversas doenças. O leucotrieno B4 (LTB4) apresenta um papel importante na defesa do organismo contra infecções e processos inflamatórios ao desencadear o recrutamento de células da imunidade inata, sendo um dos elementos quimiotáticos mais potentes para neutrófilos. Neutrófilos e monócitos produzem LTB4 e são as principais fontes deste mediador no sangue e no local da inflamação (KONIG *et al.*, 2019).

O conjunto de mecanismos que operam para encerrar o processo inflamatório e iniciar a restauração do tecido é conhecido como resolução da inflamação. O término da resposta inflamatória e transição para o estado homeostático é um processo ativo e altamente regulado, ocorrendo a mudança dos mediadores pró-inflamatórios para lipoxinas anti-inflamatórias indutoras da resolução (MEDZHITOV, 2010). Esta troca ocasiona uma transição do recrutamento de neutrófilos para monócitos e macrófagos, que realizam a captação de detritos, células apoptóticas e microrganismos, induzindo a regeneração tecidual (SERHAN & SAVILL, 2005).

Se o gatilho inflamatório não for eliminado, a fase de resolução não é adequadamente induzida, sendo instalado um estado de inflamação crônica. Ainda que não seja a causa primária de doenças como aterosclerose, obesidade, câncer, asma e esclerose múltipla, a inflamação não resolvida contribui significativamente para sua patogênese (NATHAN & DING, 2010).

O controle do processo inflamatório e tratamento das doenças crônicas podem ser realizados com diferentes intervenções terapêuticas. Os medicamentos mais utilizados são os anti-inflamatórios não-esteroidais, que atuam impedindo a produção de prostaglandinas através da inibição das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2). Além da atividade anti-inflamatória, estes fármacos também apresentam ação antipirética e analgésica, sendo amplamente utilizados no tratamento de dor, febre e distúrbios inflamatórios (BINDU *et al.*, 2020).

Outra abordagem terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias ou autoimunes são os glicocorticoides secretados pelo córtex da adrenal. Os glicocorticoides endógenos (em humanos, principalmente o cortisol) são essenciais para a manutenção da homeostase e atuam em inúmeros processos fisiológicos (CAIN & CIDLOWSKI, 2017). Os glicocorticoides também regulam processos em todas as fases da inflamação. Estes hormônios

ativam genes que codificam inibidores da sinalização de TLRs, impedem a produção de prostaglandinas ao inibir a liberação de ácido araquidônico, induzem enzimas que inativam proteínas da família das MAPKs, bloqueiam as cascatas de sinalização da via NF-κB, dentre outros mecanismos anti-inflamatórios (RHEN & CIDLOWSKI, 2005).

Em geral, glicocorticoides sintéticos apresentam maior afinidade aos receptores de glicocorticoides que os endógenos, além de serem mais potentes por não estarem sujeitos a inibidores endógenos da atividade do cortisol (CAIN & CIDLOWSKI, 2017). Por esta razão, glicocorticoides sintéticos como a dexametasona são amplamente utilizados como medicamentos no tratamento de diversos distúrbios inflamatórios, como doenças alérgicas, doenças de pele, colite ulcerativa, artrite, lúpus, psoríase e distúrbios respiratórios (KIM *et al.*, 2017).

Contudo, sabe-se que o uso prolongado de corticoides pode ocasionar efeitos colaterais como insuficiência adrenal, aumento do risco de infecções em feridas, hiperglicemia, hipertensão, hipertrigliceridemia e até mesmo o desenvolvimento de diabetes mellitus (POLDERMAN *et al.*, 2019). Tais adversidades têm levado à busca por novas estratégias para o tratamento de doenças inflamatórias, como o uso de produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias (AZAB *et al.*, 2016), isolados ou em sinergia com outros fármacos, objetivando a aplicação de menores concentrações do medicamento e redução de seus efeitos colaterais (GHENSI *et al.*, 2019).

Dentre os inúmeros produtos naturais sendo investigados pelos seus potenciais efeitos anti-inflamatórios, destacam-se os produtos elaborados pelas abelhas, como o mel, a geleia real, o pólen de abelha e a própolis. A utilização dos produtos apícolas pela humanidade é antiga, e data dos antigos egípcios, gregos, romanos e persas (FRATELLONE *et al.*, 2016; WEIS et al., 2022).

Devido à sua notoriedade na medicina popular, a própolis tem despertado o interesse dos pesquisadores devido ao seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. Diversos trabalhos acerca da composição química e propriedades biológicas da própolis foram publicados nas últimas décadas (BANKOVA, 2005; SFORCIN & BANKOVA, 2011; SFORCIN, 2016).

A própolis é um produto natural de composição complexa produzido pelas abelhas a partir de materiais coletados em brotos de árvores, seivas, resinas, mucilagens e outras fontes vegetais (ZABAIOU *et al.*, 2017). O produto apresenta uma textura variável, sendo algumas amostras duras e friáveis, outras moldáveis e pegajosas. A coloração da própolis varia entre

verde, vermelho e marrom e, em geral, seu odor é resinoso e aromático (SALATINO *et al.*, 2011).

A maior parte da própolis *in natura* compreende resinas de plantas e cera de abelha. Em menor escala, também fazem parte de sua composição pólen, óleos essenciais e outras substâncias orgânicas. Centenas dessas substâncias já foram identificadas, incluindo flavonoides, ácidos aromáticos, ésteres, terpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (BANKOVA *et al.*, 2014; BRAAKHUIS *et al.*, 2019).

A etimologia da palavra própolis vem do grego, derivada de *pro*, referente a "em favor de" ou "defesa", e *polis*, referente a "cidade", ou seja, um produto envolvido na defesa da colmeia. As abelhas utilizam a própolis para selar as aberturas da colmeia, o que além de impedir a entrada de intrusos, contribui para manter a temperatura interna constante. A própolis também é utilizada pelas abelhas para embalsamar invasores mortos pesados demais para serem transportados para fora da colmeia, evitando a decomposição e servindo como uma importante defesa contra microrganismos (SALATINO *et al.*, 2005).

Ao longo das últimas décadas, diversos estudos têm demonstrado as propriedades farmacológicas da própolis e suas aplicações biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora, gastroprotetora, cicatrização de feridas, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e imunomoduladora (ZABAIOU *et al.*, 2017; RIPARI *et al.*, 2021). Nosso grupo de pesquisa tem confirmado essas propriedades em recentes trabalhos e estudado in vitro a ação da própolis e de seus componentes em células do sistema imune de seres humanos (BÚFALO & SFORCIN, 2015; CONTI *et al*., 2016; SANTIAGO *et al*., 2016; CARDOSO *et al*., 2017; CONTE *et al*., 2021).

Diferentes tipos de própolis são produzidos mundialmente, tendo em vista que a composição da própolis varia de acordo com as espécies de plantas utilizadas como fonte de matéria-prima. Na Europa e América do Norte, as abelhas produzem a própolis a partir do álamo; na Rússia, as principais espécies vegetais utilizadas são do gênero *Betula*. A própolis mediterrânea é produzida a partir de plantas da família Cupressaceae; a própolis do Pacífico, encontrada em Taiwan e na Indonésia, é elaborada a partir de *Macaranga tanarius*. Na América Latina, as principais variedades de própolis são: "vermelha", produzida a partir de árvores do gênero *Dalbergia*, encontrada em regiões de Cuba, México e Brasil (SFORCIN & BANKOVA, 2011) e a "verde", cuja principal fonte botânica é o arbusto da espécie *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecido como "alecrim-do-campo" (PARK *et al.*, 2004; SALATINO *et al.*, 2005). A própolis verde é, comercialmente, uma das mais

importantes do mundo, sendo exportada para países como a China, Japão e Alemanha (FERREIRA *et al*., 2017a).

Recentemente, está sendo investigada uma nova amostra de própolis produzida na caatinga nordestina, tendo como fonte vegetal predominante a *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., syn. *M. hostilis*, conhecida popularmente como “jurema-preta” (figura 1).

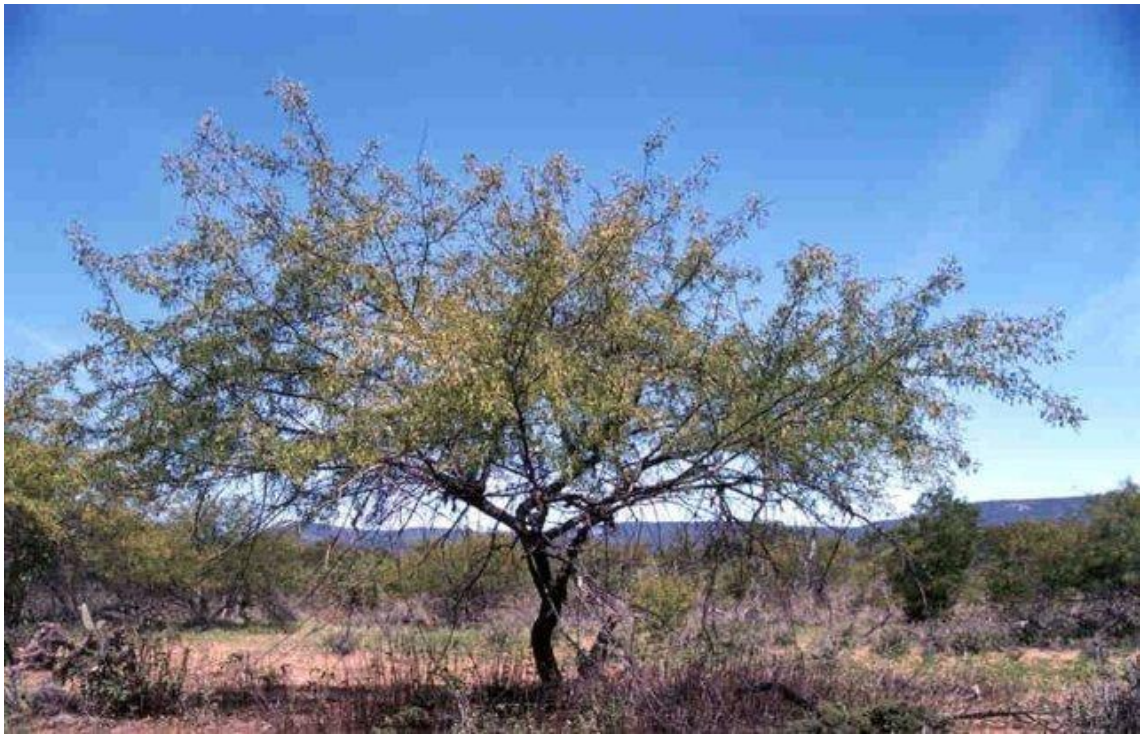
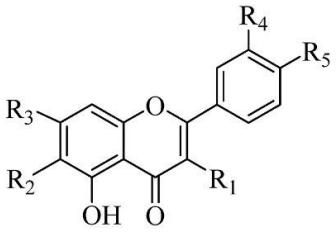
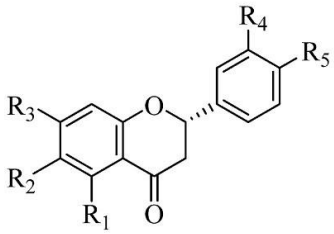


Figura 1. *Mimosa tenuiflora*. Autor: APNE/CNIP.

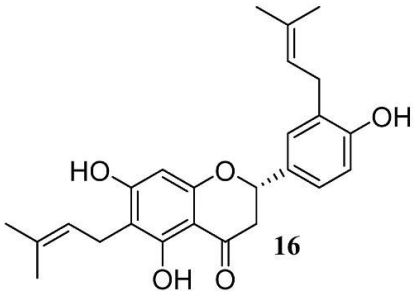
A composição química desta amostra foi analisada pelo grupo liderado pelo Prof. Titular Jairo Kenupp Bastos, FCFRP, USP, com quem temos parceria científica estabelecida há 18 anos. Foi realizada análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) do extrato hidroetanólico das amostras utilizando compostos isolados para confirmação da similaridade entre *M. tenuiflora* e a própolis. O estudo fitoquímico do extrato de própolis a partir de *M. tenuiflora* revelou 16 flavonoides, sendo 11 flavonois, quatro flavanonas e uma flavanona prenilada (figura 2), como segue: *santin* (**1**), *ermanin* (**2**), *quercetin 3-methyl ether* (**3**), *viscosin*e (**4**), *axillarin* (**5**), *isokaempferide* (**6**), *kaempferide* (**7**), *tamarixetin* (**8**), *kumatakenin* (**9**), *penduletin* (**10**), *quercetagetin 3,6, 7-trimethyl ether* (**11**), *sakuranetin* (**12**), *eriodictyol 5-O-methyl ether* (**13**), *5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavanone* (**14**), *eriodictyol-7,3'- methyl ether* (**15**) e *macarangaflavanone B* (**16**) (SON *et al*., 2022).



1 $R_1 = R_2 = R_5 = OCH_3$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$
2 $R_1 = R_5 = OCH_3$, $R_3 = OH$, $R_2 = R_4 = H$
3 $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = R_4 = R_5 = OH$
4 $R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = R_5 = OH$, $R_4 = H$
5 $R_1 = R_2 = OCH_3$, $R_3 = R_4 = R_5 = OH$
6 $R_1 = OCH_3$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = R_5 = OH$
7 $R_1 = R_3 = OH$, $R_2 = R_4 = H$, $R_5 = OCH_3$
8 $R_1 = R_3 = R_4 = OH$, $R_2 = H$, $R_5 = OCH_3$
9 $R_1 = R_3 = OCH_3$, $R_2 = R_4 = H$, $R_5 = OH$
10 $R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = H$, $R_5 = OH$
11 $R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = R_5 = OH$



12 $R_1 = R_5 = OH$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OCH_3$
13 $R_1 = OCH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = R_4 = R_5 = OH$
14 $R_1 = R_5 = OH$, $R_2 = R_3 = OCH_3$, $R_4 = H$
15 $R_1 = R_5 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = R_4 = OCH_3$



16

Figura 2. Flavonoides identificados na própolis da caatinga (SON *et al*., 2022).

Há vantagens e desvantagens no estudo de extratos de própolis comparado com a investigação de compostos isolados. Por um lado, é muito provável que os compostos presentes no extrato atuem de forma tanto sinérgica quanto antagônica, estimulando e inibindo as ações uns dos outros, culminando no efeito específico da composição do extrato analisado, mas tornando difícil identificar qual(is) composto(s) é(são) responsável(is) pelas atividades biológicas da própolis (CARDOSO *et al*., 2017).

A análise de um componente isolado permite uma melhor elucidação e entendimento do seu mecanismo de ação. Além disso, se um composto apresenta efeitos promissores, é possível realizar leves modificações em sua estrutura ou produzir análogos sintéticos a fim de obter compostos ainda mais eficazes (AZAB *et al.*, 2016).

Diante das observações expostas, tivemos o interesse em analisar o potencial imunomodulador de três componentes da própolis da caatinga (*santin*, *sakuranetin* e *kaempferide*) em células mononucleares do sangue periférico humano, avaliando a produção de citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e vias intracelulares.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a possível ação imunomoduladora da própolis de *M. tenuiflora* e de alguns de seus constituintes isolados em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humanas, explorando suas possíveis ações pró- ou anti-inflamatórias.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Verificar o possível efeito citotóxico da própolis da caatinga e de seus constituintes isolados sobre PBMCs humanas estimuladas ou não com LPS pelo método do MTT;
- ✓ Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8) e anti-inflamatória (IL-10) através de ensaio imunoenzimático (ELISA) por PBMCs estimuladas ou não com LPS;
- ✓ Analisar a produção de prostaglandina E2 e leucotrieno B4 por PBMCs estimuladas com LPS através de ensaio imunoenzimático (ELISA);
- ✓ Avaliar a expressão gênica de NF-kB e da p38 MAPK por PBMCs estimuladas com LPS através de RT-qPCR.

3. Material e Métodos

Este projeto é parte de um projeto temático (FAPESP – 2017/04138-8) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (CAAE: 65308322.8.0000.5411).

3.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis e isolamento de seus constituintes

A própolis foi produzida por *Apis mellifera* L. a partir de *M. tenuiflora* na caatinga nordestina, em Remanso, Bahia. A planta foi taxonomicamente identificada pelo Prof. Dr. Milton Groppo, sendo depositado o *voucher specimen* (SPFR: 15118) no Herbário do Departamento de Biologia, USP (SON *et al.*, 2022).

O extrato de própolis (PM) foi diluído em etanol 70% e seus constituintes foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), para utilização nos ensaios imunológicos. Os compostos utilizados neste projeto foram *santin* (ST), *sakuranetin* (SK) e *kaempferide* (KF).

3.2. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico e condições experimentais

O sangue foi obtido de 5 indivíduos voluntários aparentemente saudáveis, que assinaram um termo de consentimento para doação de sangue dando ciência desta pesquisa (Anexo 1). Foram aceitos indivíduos de ambos os gêneros, acima de 18 anos, não obesos, não fumantes e que não estivessem utilizando nenhum tipo de medicação.

Amostras de sangue (20 mL) foram coletadas e colocadas em tubos estéreis contendo 0,2 mL de heparina. Após centrifugação, as células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, UK). O anel rico em células foi coletado e lavado em meio RPMI 1640, em centrifugação a 200 *g*. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 1 mL de meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (“meio completo”). A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer com azul de tripan, para posterior ajuste da concentração celular em 1 x 10^6 células/mL.

Inicialmente (Experimento 1), as culturas celulares foram incubadas com PM nas concentrações 5, 25 e 50 µg/mL e SK, ST e KF nas concentrações 20, 50 e 100 µM por 18 h a 37ºC e 5% de CO_2. Em seguida foi avaliada a viabilidade celular e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior avaliação da produção de citocinas.

Após realização destes experimentos em “condições basais”, ou seja, em que as células foram incubadas com os tratamentos sem terem sido estimuladas previamente, foi adotado um novo protocolo (Experimento 2), no qual as PBMCs foram inicialmente ativadas por LPS (0,1 µg/mL) por 2 h e posteriormente foram acrescentados os tratamentos: PM nas concentrações 2,5 e 5 µg/mL, SK, ST e KF nas concentrações 50, 100 e 200 µM e dexametasona (DEXA) na concentração 0,5 µM para incubação por mais 18 h. A adição destas variáveis à cultura de PBMCs previamente incubados com LPS visa simular o tratamento de uma condição inflamatória. Após avaliação da viabilidade celular, o sobrenadante foi congelado para posterior determinação de citocinas e eicosanoides.

A DEXA foi obtida comercialmente (Sigma, EUA) e utilizada como controle negativo. Para controle do solvente da própolis e dos compostos isolados, nos experimentos 1 e 2 as PBMCs foram incubadas com a porcentagem correspondente às maiores concentrações de etanol 70% (0,28%) e DMSO (0,13%) utilizadas. No experimento 2, tais variáveis também foram adicionadas apenas após a incubação prévia das células com LPS por 2 h.

3.3. Avaliação da viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA). O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido a formazan. Após incubação por 18 h das culturas celulares com os diferentes estímulos, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 300 µL de MTT dissolvido em meio completo, seguido de posterior incubação a 37 °C por 3 h. Após este período, o MTT foi retirado e foram adicionados 200 µL de DMSO. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade ótica em microleitor 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%.

3.4. Determinação de citocinas pela técnica de ELISA

A determinação da concentração de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) com o sobrenadante coletado anteriormente. Inicialmente, foram adicionados 100 µL de salina tamponada com fosfato (PBS) e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R & D Systems, EUA) às placas de poliestireno (Maxisorp Nunc, EUA), e incubadas *overnight* a 4ºC 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 (1%) (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 biotinilado, 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 30 minutos a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de H_2SO_4 2N. A leitura foi realizada em microleitor de ELISA com filtro de 490 nm.

3.5. Determinação de prostaglandina E2 e leucotrieno B4

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

3.6. Expressão gênica do NF-κB e p38 MAPK por RT-qPCR

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foi realizada utilizando sistema de PCR em tempo real QuantStudio® 3 para avaliar as alterações na expressão do mRNA nos genes mencionados na tabela 1. O RNA total foi extraído das células com reagente Ambion TRIzol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, EUA). A integridade e a concentração de RNA foram avaliadas espectrofotometricamente, utilizando o leitor de microplaca Multi-Mode HTX com acessórios para placas Take-3 Micro-Volume (BioTek, EUA). Posteriormente, o RNA total foi tratado com Dnase I (Invitrogen, EUA). A síntese de cDNA foi realizada com kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, EUA). O qPCR foi realizado em um volume total de 10 µl, contendo 5 µL PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,4 µL de cada iniciador, 1 µL de cDNA (100 ng) e 3,2 µL de H_2O livre de nuclease. As expressões relativas foram analisadas pelo método CT comparativo (ΔΔCt), normalizados pela expressão dos genes de referência GAPDH e 18S.

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

Gene (ID)	*Primer*	5'- 3' Sequência	Condições da reação
***NF-kB1* (4790)**	*Forward*	CAC CTG TTC CAA AGA GCA CC	95°C – 15s; 59°C – 30s; 72°C – 30s
	Reverse	G GTT CAG GAG CTG CTG AAA C	
***p38 MAPK* (5594)**	*Forward*	GAG AAC TGC GGT TAC TTA	95°C – 15s; 59°C – 30s; 72°C – 30s
	Reverse	ATG GGT CAC CAG ATA CAC AT	
***GAPDH* (2597)**	*Forward*	GAC TCA TGA CCA CAG TCC ATG C	95°C – 15s; 65°C – 30s; 72°C – 30s
	Reverse	AGA GGC AGG GAT GAT GTT CTG	
***18S* (106632259)**	*Forward*	TGC CAG AGT CTC GTT CGT TAT CG	95 C – 15s; 60°C – 30s; 72°C – 30s
	Reverse	CGG ACA GGA TTG ACA GAT TGA TAG C	

3.7. Análise estatística

O delineamento do projeto para definição do cálculo amostral e posterior análise estatística foram realizados sob orientação de docente do Departamento de Biodiversidade e Bioestatística do Instituto de Biociência de Botucatu, UNESP.

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism 5 (GraphPad, USA), utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett ($p<0,05$).

4. Resultados

4.1. Viabilidade celular

Os resultados referentes aos ensaios de viabilidade, realizados pelo teste colorimétrico do MTT, estão dispostos na Figura 3.

Apenas as concentrações 25 e 50 µg/mL do extrato de própolis, na ausência de LPS, apresentaram efeitos citotóxicos, mantendo valores por volta de 30% de viabilidade celular.

Todos os tratamentos restantes, na ausência ou presença de LPS, não exibiram efeitos citotóxicos, sendo a viabilidade ≥ 80%.

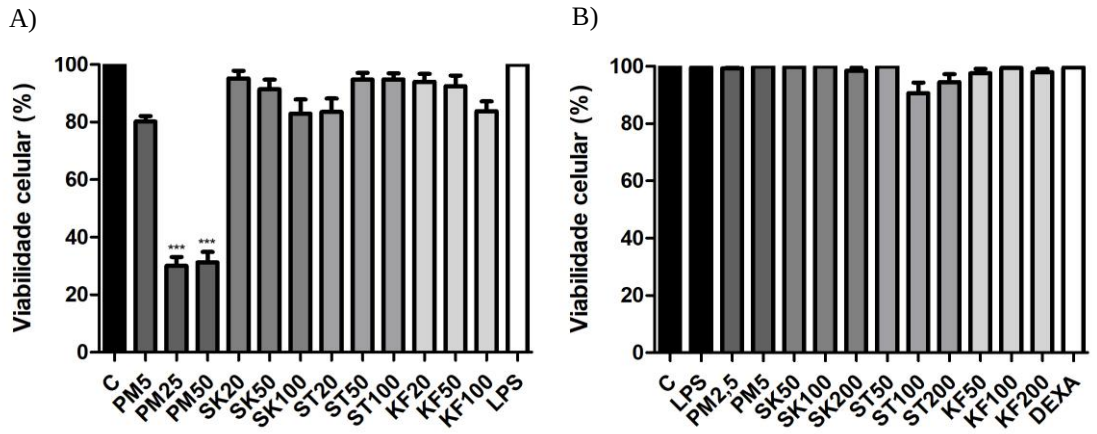


Figura 3. Porcentagem (%) de viabilidade de PBMCs após tratamentos na ausência (A) ou presença (B) de LPS (0,1 µg/mL): meio RPMI 1640 (Controle – C); extrato de própolis de *M. tenuiflora* (PM) nas concentrações 2,5 e 5 (A) ou 5, 25 e 50 µg/mL (B); *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 20, 50 e 100 (A) ou 50, 100 e 200 µM (B); e dexametasona (DEXA) (0,5 µM) (B). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5, em triplicata). Significativamente diferente do controle: *** p<0,001.

4.2. Produção de citocinas

Nas figuras 4 a 8 estão apresentados os resultados da produção de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 por PBMCs tratadas com os compostos isolados na ausência de LPS.

Tendo em vista que as concentrações 25 e 50 µg/mL do extrato de própolis apresentaram ação citotóxica e que a concentração 5 µg/mL não afetou a produção de nenhuma das citocinas em condições basais, seus efeitos não estão apresentados nas figuras.

Apenas a concentração 100 µM de *santin* estimulou significativamente (p<0,05) a produção de TNF-α e IL-1β (Figuras 4 e 5).

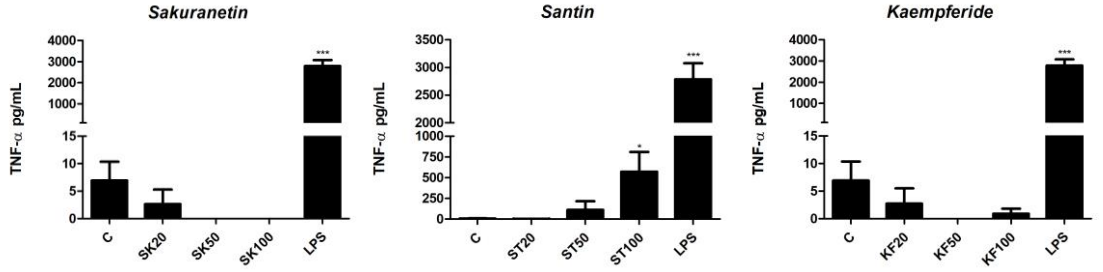


Figura 4. Produção basal de TNF-α (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C), *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 20, 50 e 100 µM e LPS (0,1 µg/mL). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do controle: * p<0,05; *** p<0,001.

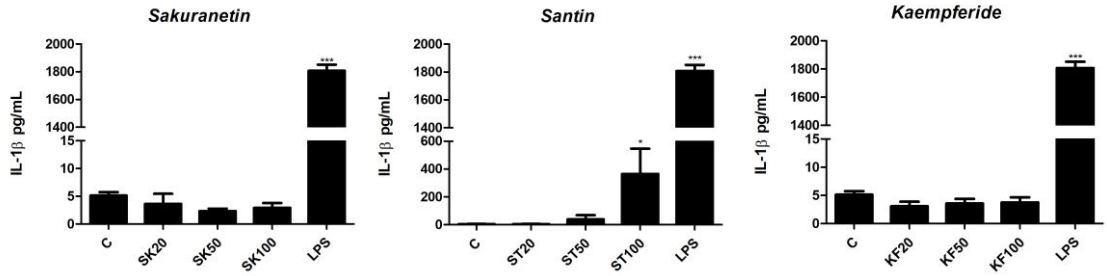


Figura 5. Produção basal de IL-1β (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C), *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 20, 50 e 100 µM e LPS (0,1 µg/mL). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do controle: * p<0,05; *** p<0,001.

Em relação à produção de IL-6, houve aumento da produção desta citocina por células estimuladas com *sakuranetin* (p<0,05) e *santin* (p<0,01), também na concentração de 100 µM (Figura 6).

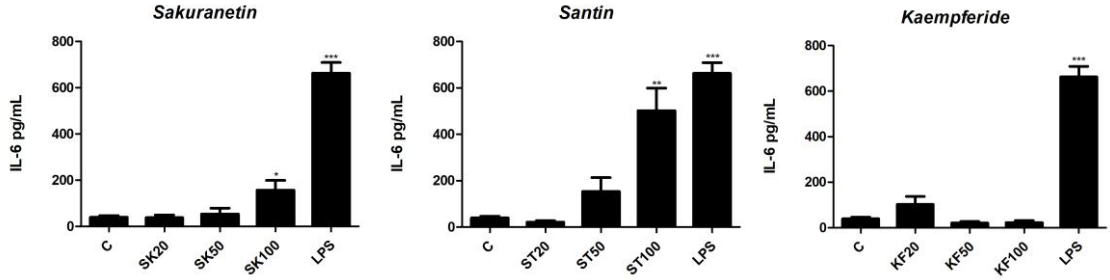


Figura 6. Produção basal de IL-6 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C), *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 20, 50 e 100 µM e LPS (0,1 µg/mL). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do controle: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Nas figuras 7 e 8, podemos observar que o composto *kaempferide* inibiu a produção de ambas as citocinas. As concentrações 50 e 100 µM de KF reduziram a produção de IL-8 ($p<0,001$), enquanto que a produção de IL-10 foi inibida com as concentrações 20 ($p<0,05$), 50 e 100 µM ($p<0,01$) deste composto.

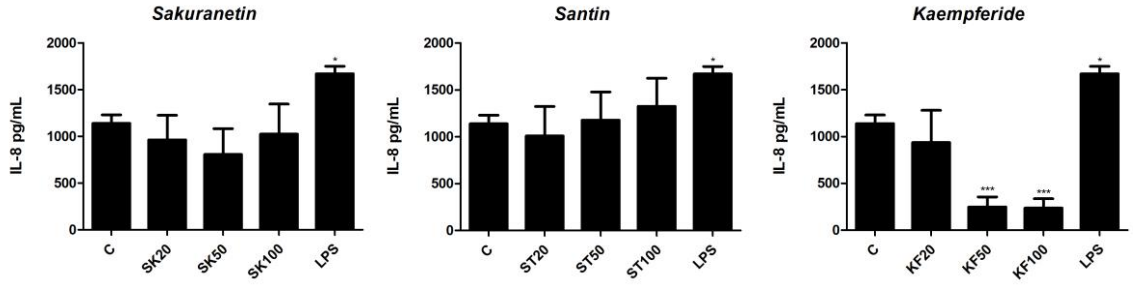


Figura 7. Produção basal de IL-8 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C), *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 20, 50 e 100 µM e LPS (0,1 µg/mL). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do controle: * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

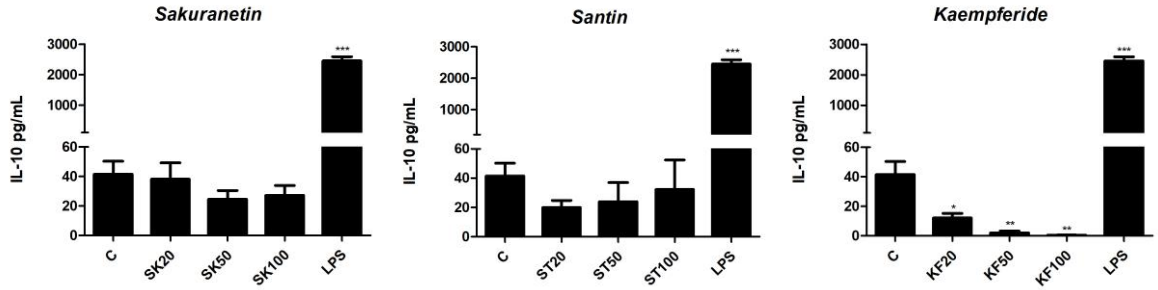


Figura 8. Produção basal de IL-10 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C), *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 20, 50 e 100 µM e LPS (0,1 µg/mL). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do controle: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Os resultados da dosagem destas 5 citocinas produzidas por PBMCs previamente incubadas com LPS (0,1 µg/mL) estão dispostos nas figuras 9 a 12, no intuito de simular uma condição inflamatória que pudesse ser modulada pelos constituintes estudados, conforme dito anteriormente.

O LPS foi utilizado como controle positivo para produção de citocinas e a DEXA foi utilizada como controle negativo.

Em relação à produção de TNF-α, a própolis e os 3 compostos estudados atenuaram a produção estimulada pelo LPS ($p<0,001$), sendo que a própolis a 2,5 µg/mL exerceu efeito inibitório menos intenso ($p<0,01$) (Figura 9).

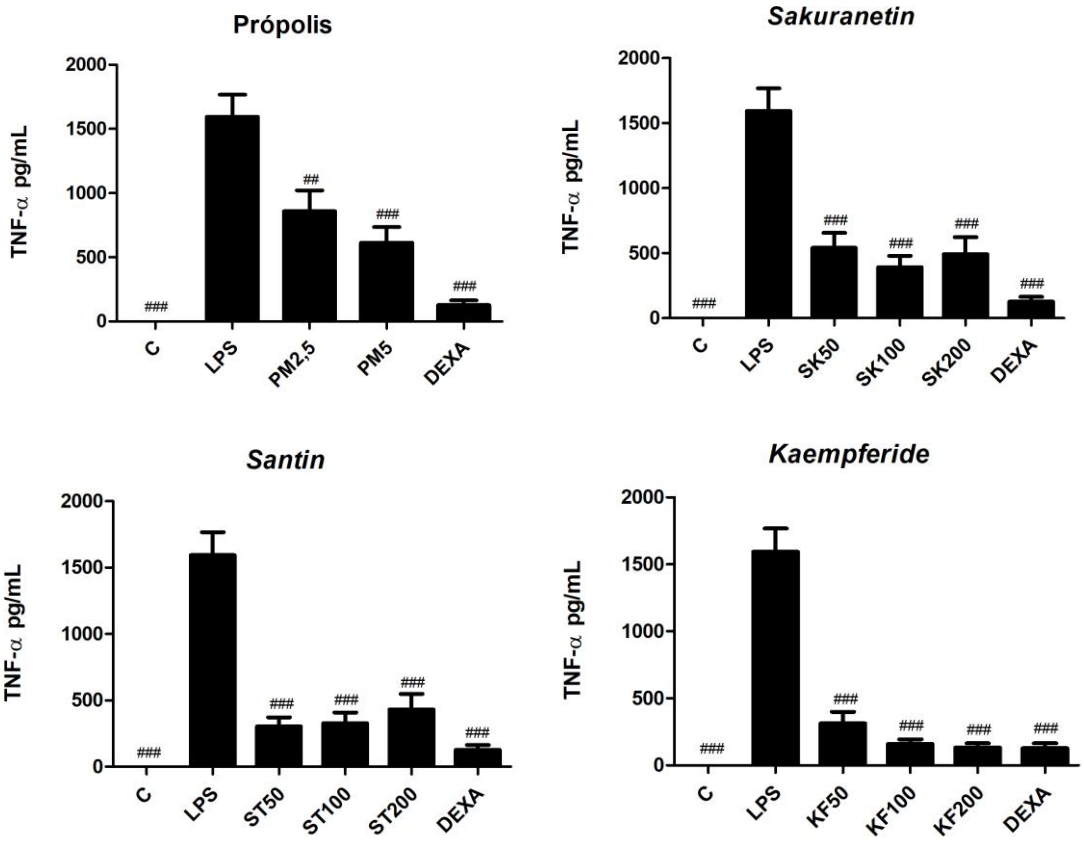


Figura 9. Produção de TNF-α (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C) ou estimuladas com LPS (0,1 µg/mL) e incubadas com extrato de própolis de *M. tenuiflora* (PM) nas concentrações 2,5 e 5 µg/mL, *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 50, 100 e 200 µM e dexametasona (DEXA) (0,5 µM). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do LPS: ## p<0,01; ### p<0,001.

Na figura 10 podemos observar que o extrato de própolis a 2,5 µg/mL (p<0,05), a concentração 50 µM de *sakuranetin* (p<0,01) e os demais tratamentos (p<0,001) também inibiram a produção de IL-1β induzida pelo LPS.

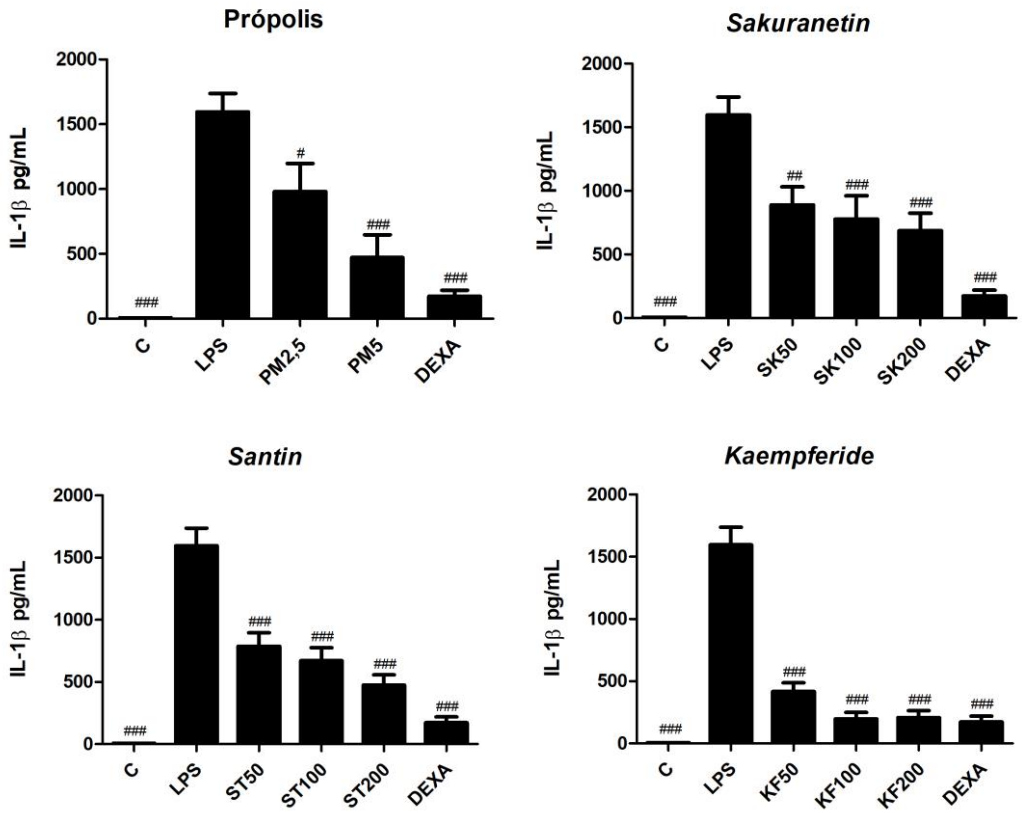


Figura 10. Produção de IL-1β (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C) ou estimuladas com LPS (0,1 µg/mL) e incubadas com extrato de própolis de *M. tenuiflora* (PM) nas concentrações 2,5 e 5 µg/mL, *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 50, 100 e 200 µM e dexametasona (DEXA) (0,5 µM). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do LPS: # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001.

Nenhum dos tratamentos afetou a produção de IL-6 e IL8, mantendo o mesmo nível estimulado pelo LPS. Na figura 11, como exemplo, encontra-se o gráfico da produção destas citocinas por PBMCs incubadas com santin.

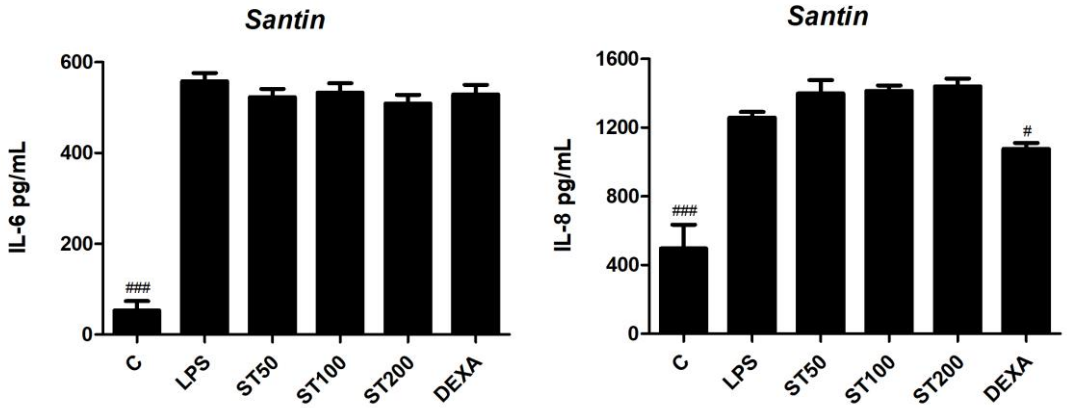


Figura 11. Produção de IL-6 e IL-8 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C) ou estimuladas com LPS (0,1 µg/mL) e incubadas com *santin* (ST) nas concentrações 50, 100 e 200 µM e dexametasona (DEXA) (0,5 µM). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do LPS: # p<0,05; ### p<0,001.

Em relação à produção de IL-10, nenhuma das concentrações de própolis e *sakuranetin* apresentaram valores significativamente diferentes do LPS, enquanto que cada concentração de *santin* inibiu a produção desta citocina com intensidades diferentes: p<0,001 com 50 µM, p<0,01 com 100 µM e p<0,05 com 200 µM. O *kaempferide*, por sua vez, inibiu fortemente a produção de IL-10 estimulada pelo LPS em todas as concentrações (p<0,001) (Figura 12).

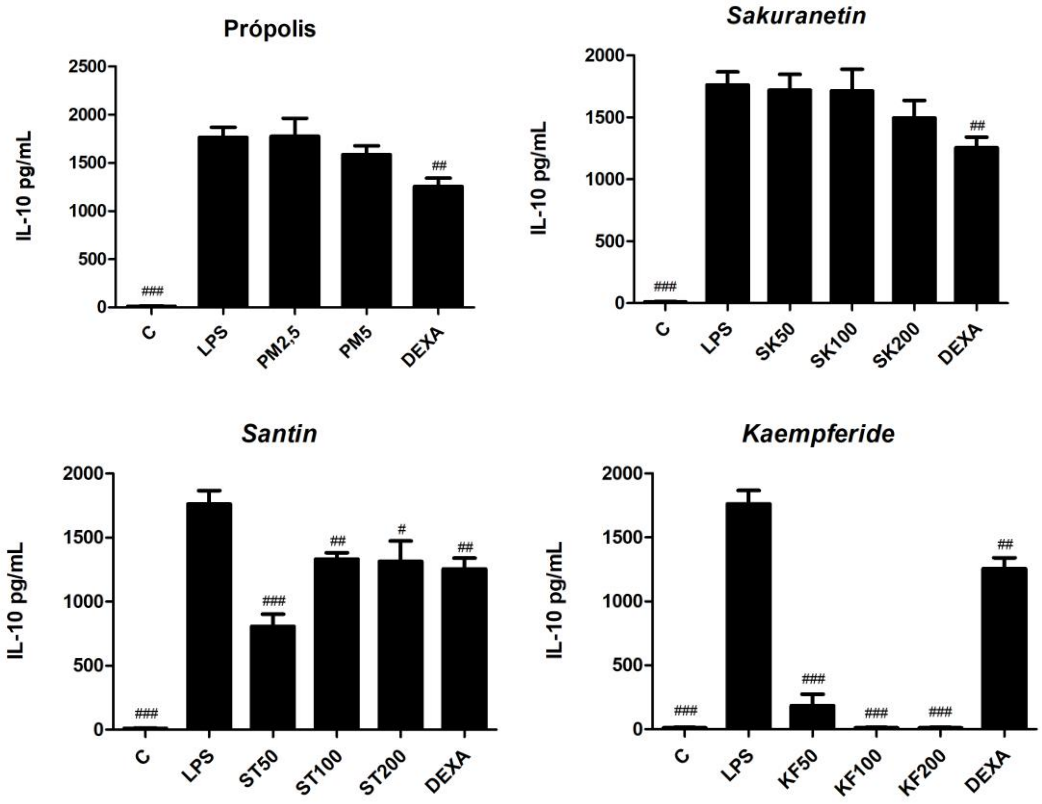


Figura 12. Produção de IL-10 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C) ou estimuladas com LPS (0,1 µg/mL) e incubadas com extrato de própolis de *M. tenuiflora* (PM) nas concentrações 2,5 e 5 µg/mL, *sakuranetin* (SK), *santin* (ST) e *kaempferide* (KF) nas concentrações 50, 100 e 200 µM e dexametasona (DEXA) (0,5 µM). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5). Significativamente diferente do LPS: # p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001.

4.3. Produção de eicosanoides

Com relação às concentrações de prostaglandina E2 e leucotrieno B4, nenhum dos tratamentos afetou significativamente a produção destes metabólitos do ácido araquidônico. Como exemplo, os dados referentes à dosagem de PGE2 estão dispostos na figura 13, mas os dados quanto à produção de LTB4 não estão apresentados.

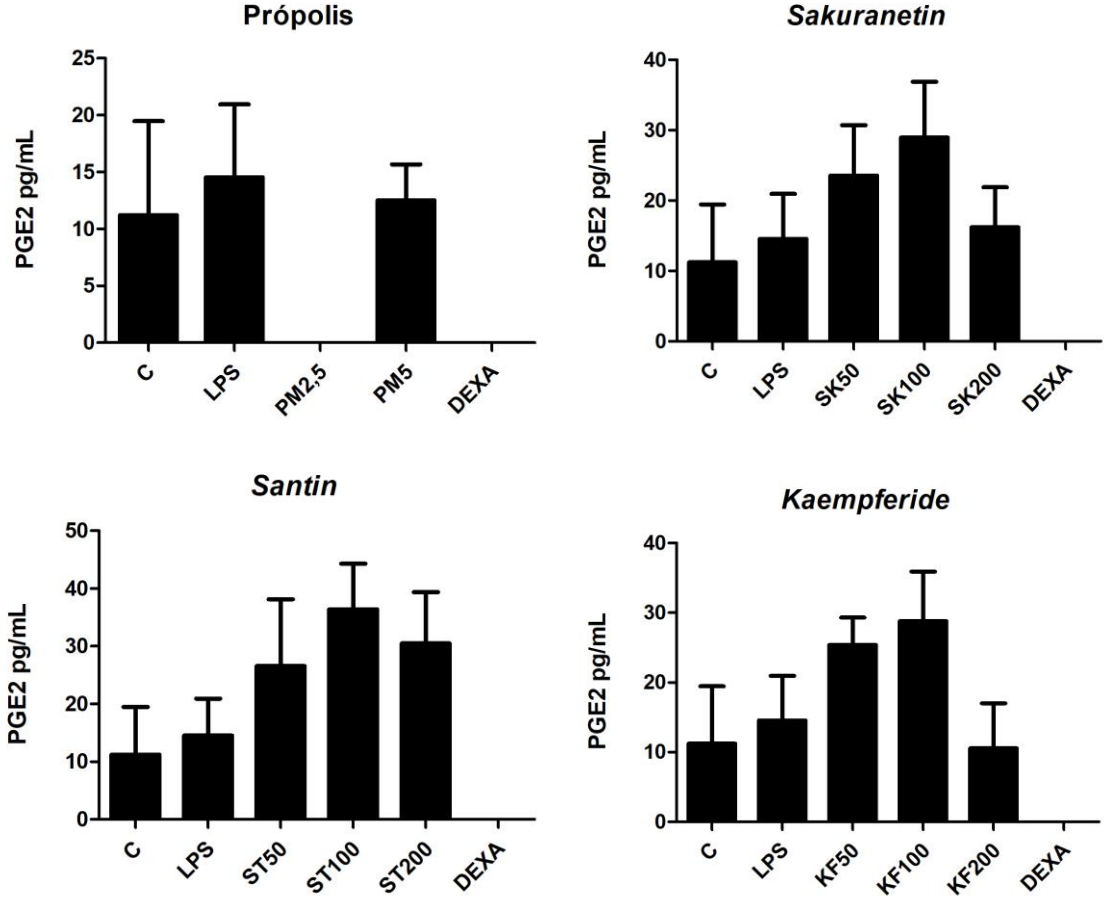


Figura 13. Produção de PGE2 (pg/mL) por PBMCs incubadas com meio RPMI 1640 (Controle – C) ou estimuladas com LPS (0,1 μg/mL) e incubadas com extrato de própolis de *M. tenuiflora* (PM) nas concentrações 2,5 e 5 μg/mL, sakuranetin (SK), santin (ST) e kaempferide (KF) nas concentrações 50, 100 e 200 μM e dexametasona (DEXA) (0,5 μM). Os dados representam média e desvio padrão (n = 5).

4.4. Avaliação de vias intracelulares

Os efeitos da própolis de *M. tenuiflora* e seus compostos isolados sobre a expressão gênica de NF-κB e de p38 MAPK por PBMCs foram investigados; contudo, os resultados obtidos demonstraram que os tratamentos não afetaram significativamente as vias estudadas, apresentando elevado desvio-padrão (dados não mostrados).

5. Discussão

A proposta deste trabalho foi observar os efeitos imunomoduladores da própolis de *M. tenuiflora* e dos compostos *santin*, *sakuranetin* e *kaempferide* sobre células imunes humanas. Para tal, utilizamos PBMCs, que compreendem majoritariamente linfócitos T e B (~80%), além de monócitos (~10%) e células *natural killer* (~10%) (DAVILA & RIOS, 2019). As PBMCs incluem populações celulares essenciais na resposta inflamatória, sendo responsáveis pela defesa do organismo contra patógenos e pela manutenção da homeostase (BUKOWSKA *et al.*, 2015), produzindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem desencadear diversos efeitos, benéficos ou patológicos (CONNOLY *et* al., 2004). Assim, as PBMCs representam uma boa opção de modelo celular para o estudo e entendimento dos processos e componentes envolvidos nas respostas inflamatórias.

Tendo em vista a grande variedade de amostras de própolis existentes, uma padronização mundial da própolis seria praticamente impossível. Assim, a utilização de amostras com composição química conhecida e fontes vegetais identificadas torna-se extremamente importante, pois possibilita a correlação entre os diferentes tipos de própolis e suas atividades biológicas, favorecendo seu uso de modo eficiente pela população (BANKOVA, 2005).

Este projeto trouxe como ineditismo a investigação de uma amostra de própolis que é pouco conhecida e começou a ser analisada nos últimos anos. Ferreira e colaboradores (2017a) foram os pioneiros a caracterizar amostras de própolis verde da caatinga (mais especificamente do Rio Grande do Norte), juntamente com extrato de jurema-preta, encontrando diferenças apenas quanto às abundâncias relativas em seus constituintes, fortes evidências que indicam que a jurema-preta é uma das principais fontes de resina da própolis verde nordestina. O mesmo grupo de pesquisa (FERREIRA *et al*., 2017b) analisou amostras de geoprópolis nordestinas produzidas por abelhas da espécie *Scaptotrigona postica*, confirmando sua hipótese de que a elaboração deste produto também deriva da *M. tenuiflora*.

Recentemente, Son e colaboradores (2022) investigaram uma amostra de própolis verde da Bahia, objetivando realizar análises quimiotaxonômicas que assegurassem que a *M. tenuiflora* é a fonte botânica primária da própolis verde da caatinga. Apesar do extrato em questão diferir da composição encontrada por Ferreira *et al*. (2017a; 2017b), por exemplo, na ausência de chalconas, ambos os extratos apresentaram majoritariamente flavonoides em sua composição, principalmente flavonóis, característica que destaca a própolis de jurema-preta de outros tipos de própolis encontrados no Brasil (SALATINO *et al*., 2021).

Além de ceder-nos uma amostra do extrato de própolis de *M. tenuiflora* analisado por Son e colaboradores (2022), o grupo liderado pelo Prof. Titular Jairo Kenupp Bastos também cedeu gentilmente alguns de seus componentes isolados. Com base na disponibilidade de dados encontrados na literatura para posterior comparação com nossos resultados, foram escolhidos três compostos para os ensaios biológicos deste trabalho: *santin* (*5,7-dihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone*), *sakuranetin* (*5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone*) e *kaempferide* (*4'-methylkaempferol*).

Na literatura pertinente, podemos encontrar trabalhos que investigaram atividades biológicas do *santin* como agente antiviral (ZHONG *et al*., 2018), antiprotozoária (MELAKU *et al*., 2017; SÜLSEN *et al*., 2007), antiedema (MARTINEZ *et al*., 1997) e antitumoral (SZOKA *et al*., 2021). Dentre os flavonoides, o *sakuranetin* é um dos constituintes vegetais mais bem caracterizado e estudado. Stompor (2020), em sua revisão, descreveu a ampla gama de estudos envolvendo as propriedades deste composto como anticancerígeno, antimicrobiano, antiprotozoário e anti-inflamatório. O *kaempferide*, por sua vez, já foi investigado quanto às suas atividades gastroprotetora (COSTA *et al*., 2018), anti-inflamatória (ELGAZAR *et al*., 2018), anti-adipogênica (KUMKARNJANA *et al*., 2019), cardioprotetor (WANG *et al*., 2017), antioxidante e osteogênica (MA *et al*., 2021).

Poucos dados sobre as ações biológicas da própolis de *M. tenuiflora* são encontrados na literatura pertinente, embora haja estudos envolvendo extratos de jurema-preta. Como exemplo, Villarreal *et al*. (2022) não observaram efeitos citotóxicos do extrato de cascas da árvore de *Mimosa tenuiflora* sobre fibroblastos humanos mesmo em concentrações de até 250 µg/mL. Apesar de a fonte botânica ser a mesma, as composições dos extratos da planta e da própolis podem apresentar diferenças, tendo em vista que as partes das plantas utilizadas na formulação do extrato de Villarreal e colaboradores e as visitadas pelas abelhas para elaboração da própolis utilizada no nosso trabalho são diferentes. Sendo assim, é possível inferir que os compostos específicos presentes no extrato de própolis utilizado em nosso estudo possam ter atuado de forma sinérgica nas concentrações estudadas, culminando no efeito citotóxico observado.

Diversos estudos apontam efeitos teratogênicos, embriotóxicos e abortivos da *M. tenuiflora* quando ingerida por ruminantes como ovinos, caprinos e bovinos. Há indícios de que estes efeitos estão relacionados a compostos alcaloides presentes na jurema-preta como o *N,N-dimethyltryptamine* (DMT), um composto já conhecido por seus efeitos psicodélicos e alucinógenos (BEZERRA *et al*., 2021), porém, esta classe de compostos não foi encontrada no extrato de própolis utilizado em nosso trabalho.

Até o presente momento, não há trabalhos relatando o efeito do extrato de própolis de *M. tenuiflora* em células do sistema imune de seres humanos. Sendo assim, para escolha das concentrações do extrato utilizadas neste estudo, inicialmente 5, 25 e 50 µg/mL, tomamos como base os trabalhos anteriores de nosso grupo envolvendo própolis verde de *Baccharis dracunculifolia* (BÚFALO *et al*., 2014; CONTE *et al*., 2021).

Quanto aos compostos isolados, também não há dados na literatura sobre pesquisas realizadas avaliando seus efeitos em células imunes humanas, como células dendríticas, monócitos e macrófagos, havendo somente trabalhos publicados com células imortalizadas, como as células THP-1 (ZHONG *et al*., 2018). Assim, as concentrações iniciais dos compostos (20, 50 e 100 µM) foram adotadas com base na faixa encontrada na literatura (KIM & KHANG, 2016; ZHONG *et al*., 2018; MA *et al*., 2021). Vale ressaltar que utilizamos PBMCs em nosso projeto, o que dificulta comparações precisas com os trabalhos encontrados na literatura, que utilizaram outros modelos celulares, conforme discutido abaixo.

Os primeiros ensaios foram realizados na ausência de LPS para observação dos efeitos biológicos dos tratamentos em condições basais. Quanto a um possível efeito citotóxico, entretanto, o extrato de própolis nas concentrações 25 e 50 µg/mL apresentou viabilidade celular de aproximadamente 30%. Nessas mesmas concentrações, o extrato de própolis verde de *B. dracunculifolia* não afetou a viabilidade de monócitos ou células dendríticas humanas em trabalhos anteriores do nosso grupo (BÚFALO *et al*., 2014; CONTI *et al*., 2016; CONTE *et* al., 2022).

Tomados em conjunto, esses dados reforçam a necessidade de mais estudos com o extrato de própolis de *M. tenuiflora*, visando confirmar seus possíveis efeitos citotóxicos em outras células humanas, bem como de seus compostos, visando identificar quais compostos podem ser responsáveis por suas atividades.

Os três compostos investigados neste trabalho não afetaram a viabilidade de PBMCs em nenhuma das concentrações estudadas. Na literatura, trabalhos com outras linhagens celulares também não encontraram efeitos citotóxicos do *sakuranetin* em concentrações semelhantes. KIM & KHANG (2016) cultivaram macrófagos peritoneais de camundongos com *sakuranetin*, o qual só apresentou efeitos citotóxicos a partir de 400 µM. SANTANA e colaboradores (2019) também não encontraram efeitos citotóxicos ao incubarem células da linhagem RAW 264.7 com concentrações de *sakuranetin* de até 50 µg/mL. Contudo, ABAD *et al*. (2004) e TIE *et al*. (2021) estudaram, respectivamente, *santin* em macrófagos peritoneais de camundongos e *kaempferide* em células da linhagem HepG2, observando efeitos citotóxicos em suas culturas a partir de concentrações de 50 µM destes compostos.

Como estes efeitos não foram observados em nosso trabalho e os valores de viabilidade celular de PBMCs tratadas com os compostos isolados se mantiveram acima de 80%, demos continuidade aos demais ensaios utilizando tais concentrações.

As citocinas são mediadores-chave da inflamação. Compreender como a própolis de *M. tenuiflora* e seus compostos regulam a produção dessas moléculas é essencial para a futura elaboração de novas abordagens terapêuticas. Assim, a produção de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 por PBMCs foi avaliada após incubação com os tratamentos. Como as concentrações 25 e 50 µg/mL do extrato de própolis afetaram a viabilidade celular, a dosagem de citocinas nessas concentrações não foi realizada. Em condições basais, o extrato a 5 µg/mL não apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle em nenhuma das citocinas analisadas.

Conti e colaboradores (2015) avaliaram a ação de três extratos de diferentes tipos de própolis (do Brasil, Cuba e México) sobre a produção de TNF-α e IL-10 por monócitos e observaram que cada um dos extratos apresentou perfis diferentes de ativação, neutralidade ou inibição quanto à produção destas citocinas em condições basais. Assim, os dados obtidos em nosso trabalho sobre a própolis de *M. tenuiflora* se assemelham com aqueles encontrados na literatura.

No que diz respeito à ação dos compostos isolados sobre a produção de citocinas em condições basais, destaca-se a ação estimuladora do *santin* a 100 µM sobre as citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6. Não encontramos trabalhos na literatura que tenham avaliado a relação desse composto com a produção destas citocinas sem que as culturas celulares não tivessem sido submetidas previamente a alguma outra condição. As citocinas pró-inflamatórias podem desempenhar diversas funções como estimular a proliferação e diferenciação celular, induzir a expressão de moléculas de adesão, promover a resposta inflamatória e exercer efeitos antivirais e antitumorais (TURNER *et al*., 2014). Por mais que sua superprodução possa levar ao desenvolvimento de patologias inflamatórias, a produção defeituosa destas citocinas pode resultar em respostas imunes falhas e infecções descontroladas. Sendo assim, o *santin* pode ser um produto promissor para situações em que um perfil ativador de células do sistema imune seja desejado.

Ainda sobre a produção de citocinas em condições basais, o *kaempferide* apresentou atividade inibitória sobre a produção de IL-8 e IL-10. A IL-8 é uma quimiocina que age como um gatilho potente para a migração e proliferação celular, sendo, portanto, um agente pró-inflamatório (KAYN *et al*., 2019), enquanto que a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória que desencadeia uma resposta desativadora/imunossupressora, principalmente

por meio da inibição transcricional de citocinas e quimiocinas, bem como de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras e de adesão (SARAIVA *et al*., 2020). Como o *kampferide* inibiu a produção de ambas as citocinas, sua ação não pode ser facilmente definida como pró- ou anti-inflamatória, mas depende do contexto analisado.

Além disso, a produção basal de TNF-α expressou níveis baixos, de forma que a produção de TNF-α de células tratadas com *kaempferide* a 50 µM, mesmo com valores zerados, não apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle. O mesmo pôde ser observado nas concentrações 50 e 100 µM de *sakuranetin*. Dessa forma, visando elucidar melhor a relação da própolis de *M. tenuiflora* e seus componentes sobre a produção de citocinas por PBMCs, novos ensaios foram realizados adotando um protocolo no qual as células foram pré-incubadas com 0,1 µg/mL de LPS por 2 h. Este protocolo simula uma condição inflamatória e permite a observação de possíveis ações imunomoduladoras após a incubação com as variáveis estudadas.

Nestes novos ensaios, as maiores concentrações de própolis que afetaram a viabilidade celular nos experimentos anteriores foram descartadas e passamos a utilizar as concentrações 2,5 e 5 µg/mL. Ademais, como os compostos a 20 µM apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre a produção de citocinas em condições basais, esta concentração foi descartada e a concentração de 200 µM foi incluída, além de 50 e 100 µM. Por fim, também avaliamos 0,5 µM de dexametasona como controle negativo, ou seja, considerando que as células seriam tratadas previamente com LPS e que os níveis de citocinas esperados eram altos, esperava-se, também, que as células tratadas com dexametasona, um agente anti-inflamatório, apresentariam níveis baixos de citocinas, o que serviria para efeitos de comparação com os níveis apresentados pelas outras variáveis. A concentração de DEXA utilizada foi escolhida com base em experimentos previamente padronizados em nosso laboratório.

Nenhum dos tratamentos afetou a viabilidade das PBMCs desafiadas previamente com LPS. Concentrações semelhantes de DEXA também não apresentaram efeitos citotóxicos em células THP-1 (DAKPA *et al*., 2022). Vale ressaltar que em todos os experimentos também foram avaliados os solventes do extrato da própolis (etanol 70%) e dos compostos isolados (DMSO), os quais não afetaram a viabilidade celular nem os demais parâmetros investigados. Isto indica que os efeitos observados foram exclusivamente devidos à própolis e seus constituintes.

De forma semelhante, tanto a própolis quanto os compostos isolados inibiram a produção de TNF-α e IL-1β estimulada pelo LPS em todas as concentrações estudadas. A DEXA, como esperado, exibiu níveis mais baixos destas citocinas. Foi possível observar um

efeito concentração-dependente dos tratamentos de forma que, quanto maior a concentração, mais o nível de citocinas produzido distanciava-se do LPS e aproximava-se da DEXA; concentrações como 100 e 200 µM de *kaempferide* até mesmo alcançaram valores muito próximos da DEXA quanto à produção de ambas as citocinas. Estes dados indicam que tanto a própolis de *M. tenuiflora* quanto os compostos analisados apresentam forte ação anti-inflamatória e potencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Nenhum dos tratamentos inibiu a produção de IL-6 e IL-8 estimulada pelo LPS, não exercendo, portanto, atividade anti-inflamatória em relação a estas citocinas.

Apenas na produção de IL-10 foi possível encontrar diferentes perfis na ação de cada tratamento. O extrato de própolis da caatinga e o composto *sakuranetin* mantiveram os níveis de IL-10 induzidos pelo LPS. Sendo a IL-10 uma citocina anti-inflamatória, este é possivelmente o melhor cenário para um fármaco que tenha por objetivo conter a inflamação: inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (que, como observado, estes tratamentos inibiram a produção de TNF-α e IL-1β) e não reduzir a produção de citocinas anti-inflamatórias. Já o *santin* apresentou variações em sua atividade inibitória quanto à produção de IL-10 de forma inversamente proporcional à concentração de composto utilizada. Por fim, todas as concentrações de *kaempferide* exibiram forte ação inibitória sobre a produção de IL-10; as concentrações 100 e 200 µM até mesmo chegaram a níveis próximos ao controle, tendo, portanto, contido completamente o efeito estimulador do LPS.

A atividade anti-inflamatória do *sakuranetin* já foi observada em diversos estudos. Em um modelo experimental de enfisema induzido por instilação de elastase em camundongos, TAGUCHI e colaboradores (2015) verificaram que o posterior tratamento com sakuranetin de animais enfisematosos atenuou a inflamação e remodelação pulmonar, além de reduzir os níveis das citocinas TNF-α e IL-1β em homogeneizados pulmonares. Em outro estudo, em que macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados simultaneamente com LPS e *sakuranetin* até 100 µM, o composto inibiu a produção de TNF-α, IL-6 e IL-12 (KIM & KANG, 2016).

Zhong *et al* (2018) avaliaram o efeito do *santin* em células THP-1 previamente infectadas com vírus da gripe A, o qual desencadeia um aumento da expressão de marcadores inflamatórios. O *santin* (60 µM) atenuou a expressão de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 induzida pela infecção, além de atuar em vários outros fatores avaliados neste trabalho. Este, porém, foi o único estudo envolvendo animais ou células previamente desafiadas e posteriormente tratadas com *santin*.

Em relação ao *kaempferide*, a literatura possui alguns trabalhos que também observaram sua ação anti-inflamatória. WANG e colaboradores (2017) avaliaram o efeito deste composto administrado a ratos que passaram previamente por lesões de isquemia/reperfusão. O *kaempferide*, além de auxiliar nos parâmetros cardíacos avaliados, também reduziu a produção de TNF-α e IL-6 induzida pela lesão. Também foi relatada a ação anti-inflamatória do *kaempferide* em células HepG2 tratadas com concentrações entre 0,1 e 10 µg/mL do composto e LPS, as quais reduziram a expressão de TNF-α, IL-1β e IL-6 estimulada pelo LPS (ELGAZAR *et al*., 2018).

Em nosso trabalho, também avaliamos os efeitos da própolis de jurema-preta e seus compostos sobre a produção de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico. Para isso, foram realizadas as dosagens de prostaglandina E2 e leucotrieno B4, mas nenhum dos tratamentos afetou a produção destes metabólitos e nem mesmo o LPS apresentou atividade estimuladora. Os níveis de pg/mL de todas as variáveis mantiveram-se baixos, o que consideramos indícios de que os metabólitos não foram devidamente detectados, possivelmente devido à sensibilidade do kit de ELISA utilizado ou ao protocolo experimental adotado. Dados muito semelhantes foram encontrados em trabalho de nosso grupo, avaliando a ação da geoprópolis em PBMC, analisando a produção destes metabólitos pelo mesmo protocolo (dados não publicados).

De acordo com o delineamento do nosso trabalho, esperava-se que pelo menos os controles positivos e negativos (LPS e DEXA, respectivamente) atuassem sobre a produção de PGE2 e LTB4, da mesma forma que observado na dosagem de citocinas. Vale ressaltar que há trabalhos na literatura que efetivamente estimularam a produção destes mediadores com LPS e posteriormente verificaram a atenuação desta indução por meio de tratamentos com dexametasona ou outros fármacos (KOROTKOVA *et al*., 2005; BHAVSAR *et al*., 2010). Sendo assim, seriam necessárias novas tentativas de dosagem destes eicosanoides.

Com relação às vias intracelulares estudadas, não foi possível elaborar conclusões consistentes diante dos dados obtidos. Além de não haver diferença estatística entre os tratamentos, foi observado elevado desvio-padrão nos resultados, o que impediu evidenciar claramente o efeito da própolis e seus constituintes nestes eventos intracelulares. De fato, dados anteriores do nosso laboratório também não evidenciaram efeito do controle positivo (LPS) em células aderentes incubadas com a própolis verde. Entretanto a própolis inibiu a via do NF-κB, apresentando efeito anti-inflamatório (CONTE *et al*., 2021). Vale ressaltar que em experimentos com seres humanos pode haver elevado desvio-padrão em comparação aos dados obtidos com animais de experimentação, provavelmente devido às diferentes variáveis

que influenciam a resposta imunológica humana como hábitos de vida, herança genética, entre outros.

Tomados em conjunto, os dados obtidos junto a este projeto indicam o potencial imunomodulador da própolis de jurema-preta e seus compostos isolados. Na ausência de LPS, o *santin* exibiu ação estimuladora sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o *kaempferide* apresentou ação inibitória. Tais achados são inéditos e relevantes, indicando a possibilidade de inclusão do *santin* em protocolos em que a estimulação de células envolvidas na imunidade é desejada, como, por exemplo, em esquemas vacinais ou antitumorais.

Visando avaliar o efeito das variáveis em uma condição inflamatória, as células foram incubadas previamente com LPS e posteriormente tratadas com a própolis e seus constituintes. Neste contexto, foi observado o potencial anti-inflamatório de todos os tratamentos, o que sugere a realização de novas investigações para verificar sua efetividade em ensaios pré-clínicos. Como exemplo, animais de experimentação poderiam ser submetidos a protocolos de indução de doenças inflamatórias ou autoimunes e posteriormente tratados com esta amostra de própolis ou com seus componentes. Futuros trabalhos poderão avaliar, também, a própolis e seus constituintes em associação com tratamentos já existentes, visando diminuir a concentração dos fármacos. Assim, a realização deste trabalho abre perspectivas para novos estudos junto a esta linha de pesquisa.

6. Conclusões

A finalização deste projeto de pesquisa com células humanas permitiu concluir que:

- ✓ Em condições basais, o *santin* apresentou ação estimuladora sobre PBMCs, enquanto o *kaempferide* exibiu ação inibitória. Estes achados permitem concluir que os constituintes da própolis de jurema-preta apresentam perfil imunomodulador, o que pode ser interessante dependendo do contexto estudado;
- ✓ Na presença de LPS, a própolis de *M. tenuiflora* apresentou atividade inibitória sobre a produção de citocinas por PBMCs, o que indica seu caráter anti-inflamatório;
- ✓ Neste contexto, os compostos isolados também apresentaram ação inibitória sobre PBMCs. Somente com relação a IL-10, os constituintes apresentaram perfil variável de resposta;
- ✓ Este corpo de dados revela o potencial anti-inflamatório desta nova amostra de própolis, bem como de seus componentes químicos, afetando parâmetros imunológicos e abrindo perspectivas para o estudo de determinados eventos biológicos que possam ser favorecidos pelas variáveis estudadas.

7. Referências bibliográficas

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; ALVAREZ, M.; GUERRA, J. A.; SILVÁN, A. M.; VILLAR, A. M. Flavonoids and a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum* inhibit anti-inflammatory mediators in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages. **Planta Medica**, v. 70, n. 01, p. 34-38, 2004.

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.

AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-inflammatory actiity of natural product. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1321, 2016.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2014.

BEZERRA, J. J. L.; PINHEIRO, A. A. V.; LUCENA, R. B. Phytochemistry and teratogenic potential of Mimosa tenuiflora (willd.) poir.(Fabaceae) in ruminants: a systematic review. **Toxicon**, v. 195, p. 78-85, 2021.

BHAVSA, P. K.; LEVY, B. D.; HEW, M. J.; PFEFFER, M. A.; KAZANI, S.; ISRAEL, E.; CHUNG, F. K. Corticosteroid suppression of lipoxin A4 and leukotriene B4from alveolar macrophages in severe asthma. **Respiratory Research**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2010.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020.

BRAAKHUIS A. Evidence on the health benefits of supplemental propolis. **Nutrients**, v.11, n. 11, p. 2705, 2019.

BÚFALO, M. C.; BORDON-GRACIANI, A. P.; CONTI, B. J.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. M. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 10, p. 1497-1504, 2014.

BÚFALO, M. C.; SFORCIN, J. M. The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 740-745, 2015.

BUKOWSKA, B.; MICHALOWICZ, J.; MARCZAK, A. The effect of catechol on human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 187-193, 2015.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233-247, 2017.

CARDOSO, E. O.; CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; CONTE, F. L.; OLIVEIRA, L. P. G.; HERNANDES, R. T.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. M. Phenolic compounds alone or in combination may be involved in propolis effects on human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 99-108, 2017.

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, n. 6, p. 7204, 2018.

CONNOLY, P. H.; CAIOZZO, V. J.; ZALDIVAR, F.; NEMET, D.; LARSON, J.; HUNG, S.; HECK, J. D.; HATFIELD, G. W.; COOPER, D. M. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of applied physiology**, v. 97, n. 4, p. 1461-1469, 2004.

CONTE, F. L.; SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; CARDOSO, E. O.; OLIVEIRA, L. G. P.; FELTRAN, G. S.; ZAMBUZZI, W. F.; GOLIM, M. A.; CRUZ, M. T.; SFORCIN, J. M. Propolis from southeastern Brazil produced by *Apis mellifera* affects innate immunity by modulating cell marker expression, cytokine production and intracellular pathways in human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, p. 135–144, 2021.

CONTE, F. L.; PEREIRA, A. C.; BRITES, G.; FERREIRA, I.; SILVA, A. C.; SEBASTIÃO, A. I.; MATOS, P.; PEREIRA, C.; BATISTA, M. T.; SFORCIN, J. M.; CRUZ, M. T. Exploring the antioxidant, anti-inflammatory and antiallergic potential of Brazilian propolis in monocytes. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 2, p. 100231, 2022.

CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. A.; BÚFALO, M. C.; HERRERA, Y. F.; ALDAY, E.; VELAZQUES, C.; HERNANDES, J.; SFORCIN, J. M. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1431-1438, 2015.

CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; CARDOSO, E. O.; FREIRE, P. P.; CARVALHO, R. F.; GOLIM, M. A.; SFORCIN, J. M. Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF-κB activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1604-1612, 2016.

COSTA, P.; ALMEIDA, M. O.; LEMOS, M.; ARRUDA, C.; CASOTI, R.; SOMENSI, L. B.; BOEING, T.; MARIOTT, M.; SILVA, R. C. M. V. A. F.; STEIN, B. P.; SOUZA, P.; SANTOS, A. C.; BASTOS, J. K.; SILVA, L. M.; ANDRADE, S. F. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4′-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, p. 82-89, 2018.

DAKPA, G.; SENTHIL KUMAR, K. J.; TSAO, N. W.; WANG, S. Y. Antcin A, a phytosterol regulates SARS-CoV-2 spike protein-mediated metabolic alteration in THP-1 cells explored by the 1H-NMR-based metabolomics approach. **Phytotherapy Research**, v. 37, p. 885-902, 2022.

DAVILA, J. A. A.; DE LOS RIOS, A. H. An overview of peripheral blood mononuclear cells as a model for immunological research of Toxoplasma gondii and other apicomplexan parasites. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1-10, 2019.

DE JAGER, W.; TE VELTHUIS, H.; PRAKKEN, B. J.; KUIS, W.; RIJKERS, G. T. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample stimulated peripheral blood mononuclear cells. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 1, p. 133-139, 2003.

ELGAZAR, A. A.; SELIM, N. M.; ADEL-HAMID, N. M.; EL-MAGD, M. A.; EL HEFNAWY, H. M. Isolates from Alpinia officinarum Hance attenuate LPS-induced inflammation in HepG2: evidence from in silico and in vitro studies. **Phytotherapy research**, v. 32, n. 7, p. 1273-1288, 2018.

FAUDZI, S. M. M.; ABDULLAH, M. A.; MANAP, M. R. A.; ISMALI, A. Z.; RULLAH, K.; ALUWI, M. F. F. M.; RAMLI, A. N. M.; ABAS, F. LAJIS, N. H. Inhibition of nitric oxide and prostaglandin E2 production by pyrrolylated-chalcones: synthesis, biological activity, crystal structure analysis, and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103376, 2020.

FERGUSON, L. R. Chronic inflammation and mutagenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 690, n. 1-2, p. 3-11, 2010.

FERREIRA, J. M.; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. New própolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552-3558, 2017a.

FERREIRA, J. M.; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; MESSAGE, D.; NEGRI, G. Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and

likely botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-6, 2017b.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSE, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 2, p. 227-235, 2007.

FRATELLONE, P. M.; TSIMIS, F.; FRATELLONE, G. Apitherapy products for medicinal use. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1020-1022, 2016.

GHENSI, P.; CUCCHI, A.; BONACCORSO, A.; FERRONI, L.; GARDIN, C.; MORTELLARO, C.; ZAVAN, B. In vitro effect of bromelain on the regenerative properties of mesenchymal stem cells. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 30, n. 4, p. 1064-1067, 2019.

GUDKOV, A. V.; KOMAROVA, E. A. p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 11, p. a026161, 2016.

HOFFMANN, A.; NATOLI, G.; GHOSH, G. Transcriptional regulation via the NF-κ B signaling module. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6706-6716, 2006.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 6008, 2019.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1754, n. 1-2, p. 253-262, 2005.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain - an update. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1170-1173, 2011.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010.

KIM, K. Y.; KANG, H. Sakuranetin inhibits inflammatory enzyme, cytokine, and costimulatory molecule expression in macrophages through modulation of JNK, p38, and STAT1. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

KIM, B. Y.; SON, Y.; LEE, J.; CHOI, J.; KIM, C. D.; BAE, S. S.; EO, S. K.; KIM, K. Dexamethasone inhibits activation of monocytes/macrophages in a milieu rich in 27-oxygenated cholesterol. **PloS One**, v. 12, n. 12, p. e0189643, 2017.

KÖNIG, S.; PACE, S.; PEIN, H.; HEINEKAMP, T.; KRAMER, J.; ROMP, E.; STRAβBURGER, M.; TROISI, F.; PROSCHAK, A.; DWORSCHAK, J.; SCHERLACH, K.; ROSSI, A.; SAUTEBIN, L.; HAEGGSTRÖM, J. Z.; HERTWECK, C.; BRAKHAGE, A. A.; GERSTMEIER, J.; PROSCHAK, E.; WERZ, O. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* abrogates leukotriene b4 formation through inhibition of leukotriene a4 hydrolase. **Cell Chemical Biology**, v. 26, n. 4, p. 524-534. e5, 2019.

KOROTKOVA, M.; WESTMAN, M.; GHEORGHE, K. R.; AF KLINT, E.; TROLLMO, C.; ULFGREN, A. K.; KLARESKOG, L.; JAKOBSSON, P. J. Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. **Arthritis & Rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3439-3447, 2005.

KUMKARNJANA, S.; SUTTISRI, R.; NIMMANNIT, U.; SUCONTPHUNT, A.; KHONGKOW, M.; KOOBKOKKRUAD, T.; VARDHANABHUTI, N. Flavonoids kaempferide and 4, 2′-dihydroxy-4′, 5′, 6′-trimethoxychalcone inhibit mitotic clonal expansion and induce apoptosis during the early phase of adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Journal of Integrative Medicine**, v. 17, n. 4, p. 288-295, 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, n. 8, p. 1287, 2017.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2017.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 3, p. 715-727, 2007.

MARTINEZ, J.; SILVÁN, A. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; SÖLLHUBER, M. Isolation of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum* as PMA-induced ear edema inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 2, p. 142-144, 1997.

MA, X.; TIAN, Y.; XUE, K.; HUAI, Y.; PATIL, S.; DENG, X.; HAO, Q.; LI, D.; MIAO, Z.; ZHANG, W.; QIAN, A. Kaempferide enhances antioxidant capacity to promote osteogenesis through FoxO1/β-catenin signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 911, p. 174555, 2021.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MELAKU, Y.; WORKU, T.; TADESSE, Y.; MEKONNEN, Y.; SCHMIDT, J.; ARNOLD, N.; DAGNE, E. Antiplasmodial compounds from leaves of *Dodonaea angustifolia*. **Current Bioactive Compounds**, v. 13, n. 3, p. 268-273, 2017.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 4, p. 495-505, 2010.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PLATANIAS, L. C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4667-4679, 2003.

POLDERMAN, J. A. W.; FARHANG-RAZI, V.; VAN DIEREN, S.; KRANKE, P.; DEVRIES, J. H.; HOLLMANN, M.W.; PRECKEL, B.; HERMANIDES, J. Adverse side-effects of dexamethasone in surgical patients–an abridged Cochrane systematic review. **Anaesthesia**, v. 74, n. 7, p. 929-939, 2019.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

RIPARI, N.; SARTORI, A. A.; HONORIO, M. S.; CONTE, F. L.; TASCA, K. I.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 281-299, 2021.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, É. W.; NEGRI, G. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementay and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SALATINO, A.; FERNANDES-SILVA, C. C.; RIGHI, A. A.; SALATINO, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 5, p. 925-936, 2011.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? **Apidologie**, v. 52, p. 1075-1097, 2021.

SANTANA, F. P.; SILVA, R. C.; GRECCO, S. D. S.; PINHEIRO, A. J.; CAPERUTO, L. C.; ARANTES-COSTA, F. M.; CLAUDIO, S. R.; YOSHIZAKI, K.; MACCHIONE, M.; RIBEIRO, D. A.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; LIMA-NETO, L. G.; LAGO, J. H. G.; PRADO, C. M.

Inhibition of MAPK and STAT3-SOCS3 by sakuranetin attenuated chronic allergic airway inflammation in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 1-14, 2019.

SANTIAGO, K. B.; CONTI, B. J.; CARDOSO, E. D. O.; GOLIM, M. D. A.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 8, p. ftw081, 2016.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature reviews immunology**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.

SARAIVA, M.; VIEIRA, P.; O'GARRA, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, p. e20190418, 2020.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SIMMONS, D. L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug discovery today**, v. 11, n. 5-6, p. 210-219, 2006.

SON, N. T.; RIBEIRO, V. P.; BASTOS, J. K. Flavonoids from green propolis of the Notheastern Brazilian Caatinga *Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir.: A chemotaxonomic aspect. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 104, p. 104473, 2022.

STOMPOR, M. A review on sources and pharmacological aspects of sakuranetin. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 513, 2020.

SÜLSEN, V. P.; CAZORLA, S. I.; FRANK, F. M.; REDKO, F. C.; ANESINI, C. A.; COUSSIO, J. D.; MALCHIODI, E. L.; MARTINO, V. S.; MUSCHIETTI, L. V. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 654, 2007.

SZOKA, L.; NAZARUK, J.; STOCKI, M.; ISIDOROV, V. Santin and cirsimaritin from *Betula pubescens* and *Betula pendula* buds induce apoptosis in human digestive system cancer cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 25, n. 24, p. 11085-11096, 2021.

TAGUCHI, L.; PINHEIRO, N. M.; OLIVO, C. R.; CHOQUETA-TOLEDO, A.; GRECCO, S. S.; LOPES, F. D. T. Q. S.; CAPERUTO, L. C.; MARTINS, M. A.; TIBERIO, I. F. L. C.; CÂMARA, N. O.; LAGO, J. H. G.; PRADO, C. M. A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF-κB, oxidative stress and metalloproteinases. **Respiratory research**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TIE, F.; DING, J. HU, N.; DONG, Q.; CHEN, Z.; WANG, H. Kaempferol and kaempferide attenuate oleic acid-induced lipid accumulation and oxidative stress in HepG2 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8847, 2021.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signaling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

VILLARREAL, S. M. L.; LUÉVANO, J. H. E.; HERNANDEZ, R. A. P.; GARCIA, E. S.; STAR, M. J. V.; RIOS, R. C.; TAPIA, M. G.; LUIS, O. E. R.; MONTES, A. C. Preliminary study of the antimicrobial, anticoagulant, antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activity of five selected plants with therapeutic application in dentistry. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 13, p. 7927, 2022.

WANG, D.; ZHANG, X.; LI, D.; HAO, W.; MENG, F.; WANG, B.; HAN, J.; ZHENG, Q. Kaempferide protects against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of the PI3K/Akt/GSK-3β pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1-11, 2017.

WEIS, W. A.; RIPARI, N.; CONTE, F. L.; HONORIO, M. S.; SARTORI, A. A.; MATUCCI, R. H.; SFORCIN, J. S. An overview about apitherapy and its clinical applications. **Phytomedicine Plus**, v. 2, p. 100239, 2022.

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. **Gastroenterology research and practice**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

ZABAIOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOEL, M.; LOBACCARO, J. M. A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214-222, 2017.

ZHONG, M.; WANG, H. Q.; YAN, H. Y.; WU, S.; GU, Z. Y.; LI, Y. H. Santin inhibits influenza A virus replication through regulating MAPKs and NF-κB pathways. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 21, n. 12, p. 1205-1214, 2019.

Anexo 1

UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS E BIOLÓGICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - RESOLUÇÃO 466/2012

Convido o(a) senhor(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa "**AÇÃO IMUNOMODULADORA DE CONSTITUINTES ISOLADOS DA PRÓPOLIS DE JUREMA-PRETA (*Mimosa tenuiflora*) EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO**", que tem como objetivo avaliar células do sangue periférico, após incubação com própolis e seus constituintes, para compreender sua ação sobre estas células. Não haverá custo algum ao participante da pesquisa. Como possíveis benefícios futuros, os resultados deste trabalho poderão fornecer subsídios para a elaboração de novos fármacos e abordagens terapêuticas incluindo componentes da própolis.

Para poder participar, o(a) Sr(a). será questionado sobre uso de medicamentos ou drogas, bem como doenças, pois estes critérios impedem a participação. O único e possível desconforto é a retirada do sangue, e após a coleta de 20 mL de sangue, o mesmo será utilizado nos laboratórios da disciplina de Imunologia, onde será desenvolvido o estudo. Informo que o material biológico colhido do(a) Sr(a). não será usado em sua totalidade e parte dele será armazenada no Biorrepositório do Instituto de Biociências de Botucatu. O sangue será colhido uma única vez e será a única forma de sua participação nesta pesquisa.

Será garantido o direito à assistência integral e gratuita a você em caso de quaisquer danos decorrentes da participação nessa pesquisa e pelo tempo que for necessário. O(a) Sr(a). tem direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

Para responder quaisquer perguntas ou dúvidas, o(a) Sr(a). poderá entrar em contato com os responsáveis por este trabalho. Para qualquer dúvida adicional, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 12:00 e das 13:30 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu, SP, fone: (14) 3880-1608/1609.

Informo que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado o consentimento para participar da pesquisa, o(a) sr(a). poderá retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo. Informamos também que todas as informações obtidas neste estudo serão identificadas somente por número, sendo que seu nome não aparecerá quando os resultados do estudo forem apresentados.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao(à) Sr(a). devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Caso o participante queira ter acesso aos resultados obtidos, poderá procurar o pesquisador responsável pelo telefone e e-mail abaixo.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas sem, no entanto, que minha identidade seja revelada:

Nome do sujeito de pesquisa: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

Arthur Alves Sartori
Mestrando em Biologia Geral e Aplicada
IB – UNESP – Campus de Botucatu
arthur.sartori@unesp.br
Fone: (14) 3880-0425 e (14) 99610-3838

Prof. Titular José Maurício Sforcin
Responsável pelo Projeto
Depto. Ciências Químicas e Biológicas
IB – UNESP – Campus de Botucatu
jose.m.sforcin@unesp.br
Fone: (14) 3880-0445