

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PCF

O extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* inibe diferentes produtos da resposta inflamatória de macrófagos

LUCAS BONATTO DE SOUZA LIMA

CASCAVEL – PR
1 DE DEZEMBRO DE 2022

LUCAS BONATTO DE SOUZA LIMA

O extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* inibe diferentes produtos da resposta inflamatória de macrófagos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientadora: Dra. Thais

Soprani Ayala

Coorientador: Prof. Dr. Rafael

Andrade Menolli

CASCADEL – PR

1 DE DEZEMBRO DE 2022

Bonatto de Souza Lima, Lucas O extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* inibe diferentes produtos da resposta inflamatória de macrófagos / Lucas Bonatto de Souza Lima; orientadora Thais Soprani Ayala; coorientadora Rafael Andrade Menolli. -Cascavel, 2022. 52 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Extratos vegetais. 2. Imunomodulação. 3. Cultura celular. I. Soprani Ayala, Thais, orient. II. Andrade Menolli, Rafael, coorient. III. Título.

LUCAS BONATTO DE SOUZA LIMA

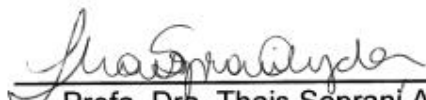
O extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* inibe diferentes produtos da resposta inflamatória de macrófagos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

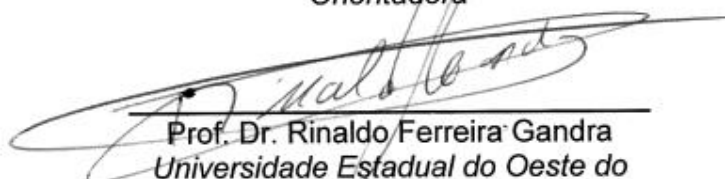
Orientador: Profa. Dra. Thais Soprani Ayala

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli


BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Thais Soprani Ayala
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE
Orientadora



Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE



Prof. Dr. Silvano Piován
Universidade Estadual do Oeste do
Paraná
UNIOESTE

Cascavel - PR

2022

BIOGRAFIA RESUMIDA

Lucas Bonatto De Souza Lima, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascido em 21 de setembro de 1992, graduou-se em Farmácia, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) em 19 de dezembro de 2017 e colou grau em 17 de janeiro de 2018. Em março de 2018, ingressou no Programa de Pós-Graduação *lato sensu* Residência em Análises Clínicas da Unioeste, finalizando em fevereiro de 2020. Trabalha como Farmacêutico Bioquímico no Hospital Universitário do Oeste do Paraná, de junho de 2021 até o momento. Desde março de 2020, é aluno do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Unioeste e desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientado pela Dra. Thais Soprani Ayala e coorientado pelo Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli.

"Quanto maior seja o número de olhares, de olhares distintos que saibamos empregar para ver uma mesma coisa, tanto maior será o nosso 'conceito' sobre ela, tanto mais completa será a nossa 'objetividade'..." (Friedrich Nietzsche)

À minha mãe (*in memoriam*), que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço à minha mãe, a pessoa a quem tudo devo e a quem jamais conseguirei expressar, em palavras, descrições dignas de sua magnitude, sabedoria e bondade, não só para comigo, mas para todos os que puderam conviver com ela.

À minha orientadora, Dra. Thais Soprani Ayala, e ao meu coorientador, Dr. Rafael Andrade Menolli, pelo suporte, ensinamentos e paciência ao longo da caminhada do mestrado; foi uma grande honra fazer parte do Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste (LIAU) e tê-los como referência. E a todos os colegas do LIAU, pois cada um teve um papel fundamental para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram, sobretudo ao Mateus, Larissa e Izabela; graças à convivência com vocês, pude manter a esperança na minha caminhada.

E, por fim, à instituição a que sou e serei eternamente grato, a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, por tornar possível minha construção acadêmica e profissional.

O EXTRATO METANÓLICO DA RAIZ DE *Lonchocarpus cultratus* INIBE DIFERENTES PRODUTOS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

RESUMO

A pesquisa científica, envolvendo extratos vegetais, consiste não apenas em uma considerável fonte de fármacos, mas também em uma importante ferramenta para estudo do sistema imunológico e do processo inflamatório. Sabe-se que plantas do gênero *Lonchocarpus* possuem metabólitos secundários com propriedades imunomodulatórias; o próprio extrato da raiz de *L. cultratus* foi alvo de estudos anteriores que demonstram atividade antiparasitária. Desse modo, utilizando técnicas de cultura celular, foi possível avaliar a influência desse extrato sobre a atividade inflamatória, por meio da dosagem de componentes da resposta imunológica e avaliando o comportamento das células frente aos estímulos de metabólitos secundários presentes no extrato, por meio do uso de técnicas espectrofotométricas e de biologia molecular. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito pró-inflamatório e anti-inflamatório do extrato de *Lonchocarpus cultratus* sobre macrófagos de linhagem. As células utilizadas foram macrófagos de linhagem RAW 264.7. A concentração utilizada do extrato metanólico da raiz de *L. cultratus* foi de 175 µg/mL. Entre as metodologias utilizadas para avaliar a influência no processo inflamatório dos macrófagos, estão a quantificação de óxido nítrico (NO), dosagem de ânion superóxido (O₂⁻), dosagem da atividade de arginase, produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), produção de interleucina 10 (IL-10) e, para análise da via de sinalização de quinase ativadas por mitógenos, foram analisadas as proteínas pERK 1/2 (também chamada de pERK 44/42). O extrato mostrou-se capaz de atenuar a atividade pró-inflamatória, reduzindo a produção de NO, O₂⁻ e TNF-α, no entanto, não aumentou a produção de IL-10 e arginase, componentes da resposta anti-inflamatória e não alterou de maneira significativa a expressão de pERK 1/2.

PALAVRAS-CHAVE: Extratos vegetais. Imunomodulação. Cultura celular.

METHANOLIC EXTRACT OF *Lonchocarpus cultratus* INHIBITS DIFFERENT PRODUCTS FROM THE MACROPHAGES INFLAMMATORY PATHWAY

ABSTRACT

The scientific research involving vegetal extracts, consists not only in a considerable source of pharmaceutical molecules, but also represents an important tool in the studies of the immunological system and the inflammatory process. It is well known that plants from the *Lonchocarpus* genus have secondary metabolites with immunomodulatory properties, and the extract from *L. cultratus* has been studied in previous research, demonstrating an anti-parasite activity. Hence, through cell culture techniques, it is possible to evaluate the influence of vegetal extracts on the inflammatory activity, analyzing the cell's response due to the stimulation by the secondary metabolites, present in these extracts. This research's objective was to evaluate the pro-inflammatory and anti-inflammatory effect of the methanolic extract of *Lonchocarpus cultratus* over macrophages. The cell lines used here were RAW 264.7 macrophages. The concentration of the methanolic extract from the roots of *L. cultratus* was 175 µg/mL. Evaluation of the inflammatory response was made through quantification of the nitric oxide (NO), dosing of superoxide anion (O₂⁻), arginase activity, production of tumoral necrosis factor alfa (TNF-α), production of interleukin 10 (IL-10) and analysis of mitogen activated protein kinase pERK ½ (also known as pERK 44/42) pathway. The extract was able to attenuate the pro-inflammatory response by downregulating the production of NO, O₂⁻ and TNF-α, however it couldn't increase the production of IL-10 and arginase, components of the anti-inflammatory process, moreover the intracellular production of pERK ½ wasn't altered significantly.

KEY-WORDS: Vegetal extracts. Immunomodulation. Cell culture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O extrato de <i>Lonchocarpus cultratus</i>	18
1.2. O sistema imunológico no combate às infecções	21
1.3. Imunomodulação de macrófagos	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Aspectos éticos da pesquisa	27
3.2. Obtenção do extrato de <i>Lonchocarpus cultratus</i>	27
3.3. Cultura dos macrófagos de linhagem RAW 264.7.....	29
3.4. Quantificação do óxido nítrico.....	30
3.5. Dosagem de ânion superóxido	31
3.6. Dosagem da atividade de arginase.....	32
3.7. Dosagem de citocinas	33
3.8. Análise das vias de sinalização	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. O efeito do LMR na produção de óxido nítrico pelos macrófagos	35
4.2. Influência do LMR sobre a produção de ânion superóxido	37
4.3. O LMR e o perfil anti-inflamatório através da atividade de arginase.....	39
4.4. Efeito do LMR na secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias	40
4.5. Efeito do LMR na via de sinalização do TLR4	42
5. CONCLUSÃO.....	45
6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	46
7. REFERÊNCIAS	47
8. ANEXOS.....	52
8.1. Anexo I	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tratamentos utilizados com as diferentes linhagens celulares.....	30
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Foto de um exemplar de <i>Lonchocarpus cultratus</i> (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima, localizado as margens do lago municipal de Cascavel – PR. Fonte: Griebler (2017).....	19
Figura 2 Fotografia de cultura celular de macrófagos de linhagem RAW 264.7 cultivados no Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste.	25
Figura 3 Obtenção do extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i> (adaptado de Bortoluzzi et al 2021).....	28
Figura 4 Reação química do ensaio de Griess. N ₂ O ₃ (Trióxido de dinitrogênio); SA (sulfonamida); DABSA (ácido diazobenzenosulfônico); NED (N-(1-naftil)-etilenodiamina); AANBSA (ácido azo-alfa-aminonaftaleno-parabenzeno-sulfônico) (adaptado de Zhou et al 2019).	31
Figura 5 Secreção de óxido nítrico por células de linhagem RAW 264.7 após tratamento com extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i> 175 µg/mL (LMR). Os valores representam a média aritmética ± desvio padrão. N=3. *p < 0,05 vs LPS; +p <0,05 vs LPS + LMR.	36
Figura 6 Produção de ânion superóxido por macrófagos de linhagem RAW 264.7 após tratamento com extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i> durante o tratamento de 24 horas. Controle negativo: meio DMEM; forbol miristato acetato 10 µg/mL; ácido dimetilssulfóxido 0,6% em meio DMEM; LMR: extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i> 175 µg/mL. Os valores representam a média ± desvio padrão. N = 3. *p-valor < 0,05 vs PMA; + p-valor <0,05 vs DMEM.	38
Figura 7 Atividade de arginase por macrófagos da linhagem RAW 264.7, após tratamento com extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i> 175 µg/mL por 24 e 48 horas (respectivamente A e B). Os valores representam a média ± desvio padrão. N=5.	40
Figura 8 Produção de TNF-α por macrófagos da linhagem RAW 264.7, após tratamento com extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i> 175 µg/mL por 24 horas. Os valores representam a média ± desvio padrão. N = 4. *p<0,05 vs LPS.	41
Figura 9 Produção de IL-10 por macrófagos da linhagem RAW 264.7, após tratamento com extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i> 175 µg/mL por 24 horas. Os valores representam a média ± desvio padrão. N = 3.	42

Figura 10 Efeito de extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* sobre a via de sinalização das MAPK macrófagos de linhagem RAW 264.7 após 30 minutos de tratamento. A) Membrana representativa do Western blot sondada com anticorpos fosfo-ERK 44 e anti-GAPDH (37 kDa). B) Relação fosfo-ERK 42/GAPDH C) Relação fosfo-ERK 42/GAPDH. Os valores representam a média \pm desvio padrão. N=3.43

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais da Unioeste
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase 2
CSF	Fator estimulador de colônias
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Ácido dimetilsulfóxido
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas do oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KOH	Hidróxido de potássio
LIAU	Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste
LMR	Extrato metanólico da raiz de <i>Lonchocarpus cultratus</i>

LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteínas quinase ativadas por mitógenos
MP	Macrófagos peritoneais
MTT	3-metil-[4-5-8-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintases de óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PAINS	<i>Pan Assay Interference Compounds</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCF	Programa de Ciências Farmacêuticas
PMA	Forbol miristato acetato
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
STAT3	Fator de ativação da transcrição e transdutor de sinal 3
STAT6	Fator de ativação da transcrição e transdutor de sinal 6

TBS	<i>Triss Buffered Saline</i>
TLR	Receptor tipo-Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná

1. INTRODUÇÃO

1.1. O extrato de *Lonchocarpus cultratus*

A pesquisa científica, envolvendo plantas com foco na busca por fitoquímicos, substâncias biologicamente ativas em uma planta, por inúmeras vezes, mostrou-se uma importante fonte de fármacos, pois apresentam uma grande diversidade de estruturas que frequentemente demonstram uma ampla variedade de atividades farmacológicas (CATANZARO *et al.*, 2018; DE LIMA *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2021). Logo, muitos componentes descobertos são biologicamente ativos e possuem potenciais de exploração para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas moléculas bioativas (ESTRELA *et al.*, 2017; CATANZARO *et al.*, 2018). Diversos extratos de plantas exibem a capacidade de modular respostas do sistema imunológico e muitos metabólitos secundários, como polifenóis, polissacarídeos, chalconas, terpenos, flavonoides e alcaloides, são alvo de estudos para avaliar suas atividades imunomodulatórias (CATANZARO *et al.*, 2018; DA SILVA LANDIM *et al.*, 2019).

O gênero *Lonchocarpus* possui cerca de 150 espécies, incluindo 24 delas nativas do Brasil, sendo conhecidas por apresentarem atividade inseticida e pesticida (MAGALHÃES *et al.*, 2002) e por sua ação antibacteriana e antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2014). Essas atividades podem estar relacionadas aos seus metabólitos secundários, por exemplo, os flavonoides comuns a espécies desse gênero (BORGES-ARGÁEZ *et al.*, 2007). Algumas espécies de *Lonchocarpus* são utilizadas na medicina popular africana com finalidades analgésicas e anti-inflamatórias (UDO; EHEME; IGWE, 2020) e outras desempenhando ações inibitórias sobre neurônios responsáveis pela transmissão de estímulos dolorosos (AMORIM *et al.*, 2016).

A espécie *Lonchocarpus cultratus* é um tipo de árvore que varia de 4 a 30 metros de altura, com tronco de 40 a 50 centímetros de diâmetro (figura 1). A madeira é moderadamente pesada, dura, compacta, suscetível a polimento e moderadamente resistente ao ataque de organismos xilófagos. Floresce entre dezembro e janeiro e a maturação dos seus frutos ocorre durante os meses de maio a agosto (LORENZI, 1998). Popularmente, a planta também é identificada por vários nomes, dependendo da região onde é nativa. Na Bahia, é conhecida como “cabelouro”; em São Paulo, “embira branca”; no Espírito Santo, “embira d’anta” e “embira de macaco”; em Minas

Gerais, “embira de carrapato”; nos estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal, é chamada de “embira de sapo”; no Paraná, é “embira de caboclo” (DA SILVA; TOZZI, 2012).



Figura 1 Foto de um exemplar de *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima, localizado as margens do lago municipal de Cascavel – PR. Fonte: Griebler (2017).

A identificação dos metabólitos secundários de *L. cultratus* não é completamente elucidada, no entanto, alguns compostos já foram identificados (MAGALHÃES *et al.*, 2002; DA SILVA LANDIM *et al.*, 2019). Um estudo de Borges-Argáez e colaboradores relatou a presença de flavonoides em outras espécies de plantas do gênero *Lonchocarpus* que apresentavam atividade inibitória sobre parasita do gênero *Leishmania* (BORGES-ARGÁEZ *et al.*, 2007). Magalhães e colaboradores

realizaram a análise de extratos das raízes de *L. montanus* e, por meio de purificação por cromatografia e análise espectral, demonstraram a presença de flavonoides, derivados de benzofenona, ácidos graxos e outros compostos (MAGALHÃES *et al.*, 2007); na espécie *L. cultratus*, esses pesquisadores encontraram alcaloides por meio de técnicas de cromatografia gasosa (MAGALHÃES *et al.*, 2002). Estudos recentes, envolvendo o extrato metanólico de *L. cultratus*, evidenciaram atividades antiproliferativas sobre linhagens de células cancerígenas humanas, que podem estar associadas aos metabólitos secundários presentes nessa espécie, entre eles, chalconas, alcaloides e terpenos, identificados com base em técnicas de ressonância magnética nuclear (DA SILVA LANDIM *et al.*, 2019).

Outros Pesquisadores já estudaram os efeitos do extrato metanólico da raiz de *L. cultratus* sobre diferentes parasitas. Bortoluzzi e colaboradores observaram que o extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* na concentração de 175 µg/mL demonstrou atividade contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, inibindo o crescimento das formas epimastigotas e tripomastigotas, porém, não atuando significativamente sobre as formas amastigotas (BORTOLUZZI *et al.*, 2021). Staffen e colaboradores demonstraram uma significativa atividade inibitória contra as formas promastigotas e afetando a permanência da forma intracelular amastigota de *Leishmania amazonensis* quando incubadas com o extrato metanólico da raiz de *L. cultratus* a partir da concentração de 1 µg/mL, com a maior atividade observada na concentração de 175 µg/mL e até mesmo ocasionando a alteração da morfologia desses parasitas; ademais, promove arredondamento do corpo celular e dano à membrana plasmática, resultados confirmados por citometria de fluxo (STAFFEN *et al.*, 2022).

Bortoluzzi e colaboradores realizaram a caracterização dos extratos das raízes de *Lonchocarpus cultratus* por meio de métodos qualitativos para a caracterização das classes dos metabólitos secundários presentes nas amostras. De acordo com o espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), o extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* apresentou absorvância em regiões características de ligações polares de hidrogênio a elementos eletronegativos e em grupamentos etila, metila e propila de compostos alifáticos, sugerindo a presença de terpenos (BORTOLUZZI *et al.*, 2021). Experimentos recentes utilizando extratos vegetais demonstram que metabólitos secundários da classe dos terpenos apresentam a propriedade anti-inflamatória sobre macrófagos de linhagem RAW 264.7, atenuando a produção de Óxido Nítrico (NO), Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) e Interleucina 6 (IL-6) (GUO *et al.*, 2019). No entanto, ao trabalhar com

derivados de plantas, é importante ter em mente que muitos de seus metabólitos secundários podem ter características indesejadas do ponto de vista analítico, pois vem sendo sugerida a importante informação de que extratos naturais podem apresentar uma série de moléculas altamente reativas, reconhecidas por sua interferência em ensaios biológicos, chamados de *pan assay interference compounds* (PAINS), que podem provocar resultados falso-positivos nos estudos das propriedades dos extratos naturais (JASIAL; HU; BAJORATH, 2017). Esses compostos não são facilmente detectados, representando um problema considerável principalmente durante os passos iniciais de pesquisas que envolvem extratos e produtos naturais (BOLZ; ADASME; SCHROEDER, 2021).

1.2. O sistema imunológico no combate às infecções

O sistema imunológico, de maneira geral, concede aos organismos vivos a habilidade de distinguir o que lhe é “próprio” de “não próprio” (MCCOMB *et al.*, 2019); esse sistema apresenta diversos tipos celulares e moléculas, localizados nos tecidos e na corrente sanguínea, que constantemente previnem a invasão e estabelecimento da infecção por microrganismos, estando organizado em duas grandes divisões: a imunidade inata e a imunidade adaptativa (SATTLER, 2017; GOMBART; PIERRE; MAGGINI, 2020). Já a inflamação, é o processo pelo qual leucócitos circulantes e proteínas plasmáticas são enviadas aos sítios de infecção nos tecidos e ativados para destruir e eliminar agentes infecciosos (BHUSAL; FOSTER; STONE, 2020). De modo geral, esse processo é programado primeiramente para remover o estímulo lesivo e, então, induzir ao processo que ocasiona a reparação tecidual (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017).

A Imunidade Inata é composta por barreiras naturais (como a pele e as membranas), moléculas menores (como proteínas, citocinas e sistema complemento) e células (como os monócitos e células dendríticas). O sistema imune inato é chamado dessa maneira, pois ele promove proteção contra patógenos sem a necessidade de um condicionamento dos seus componentes, ou seja, no momento em que um elemento da imunidade inata encontra um patógeno, ele imediatamente tentará destruí-lo ou removê-lo do hospedeiro (MCCOMB *et al.*, 2019).

Os monócitos são efetores e reguladores cruciais para o sistema imunológico, pois realizam a vigilância do hospedeiro, procurando por sinais de dano tecidual ou infecção em diferentes ambientes e, uma vez dentro dos tecidos, eles podem se

diferenciar, podendo tornar-se macrófagos ou células dendríticas de acordo com os estímulos presentes no microambiente (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017; COILLARD; SEGURA, 2019).

Visto que o sistema imunológico inato é responsável pela resposta rápida e precoce contra microrganismos e lesão tecidual, suas células são capazes de detectar esses elementos nocivos por meio de receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs). Existem diversos tipos de receptores; um exemplo são os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptor* - TLRs), glicoproteínas integrais de membrana, encontradas na superfície celular e nas membranas intracelulares (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021). Esses receptores são expressos principalmente por fagócitos (primariamente macrófagos e neutrófilos) e consistem em proteínas capazes de reconhecer moléculas frequentemente associadas a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* – PAMPs) e, também, moléculas liberadas após dano celular (*Damage-Associated Molecular Patterns* – DAMPs) (AMARANTE-MENDES *et al.*, 2018; CHAUHAN; VANDE WALLE; LAMKANFI, 2020; YANG; WANG; ANDERSSON, 2020). Diferentes tipos de microrganismos possuem seus respectivos PAMPs, por exemplo: alguns vírus apresentam ácidos nucleicos únicos, como RNA de fita dupla encontrados durante sua replicação, que alcançam sítios intracelulares nos quais eles não estariam presentes (GLASS; NATOLI, 2016). Outro exemplo são os lipídios complexos e carboidratos que são sintetizados por microrganismos (porém, não sintetizados por células mamíferas), como os Lipopolissacarídeos (LPS), em bactérias Gram-negativas, e o Ácido Lipoteicoico, em bactérias Gram-positivas (CORRIN; NICHOLSON, 2011; VERGADI *et al.*, 2017; CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021).

As células possuem uma grande diversidade de proteínas responsáveis por mecanismos de recebimento de sinais, transmissão de informações e indução de respostas apropriadas, induzindo a expressão de genes cujos produtos são importantes para as respostas inflamatórias. Os macrófagos (assim como diversas outras células) possuem um grupo de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que estão envolvidas na transdução de sinais de diversas vias intracelulares. Entre os diferentes grupos de MAPK, estão as proteínas MAPK P38, que respondem ao estímulo de lipopolissacarídeos (LPS), e as quinases relacionadas a sinais extracelulares (ERK 44/42 ou ERK 1/2), que estão diretamente envolvidas com o processo inflamatório (CUADRADO; NEBREDA, 2010; SUN *et al.*, 2015). Por

exemplo, a sinalização dos TLR pelos patógenos gera a ativação das MAPK que, com o auxílio do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), culmina na ativação do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) nas células; isso é crucial para gerar respostas imunes, ocorrendo a ativação de diversas vias de sinalização intracelulares, o que gera fatores de transcrição, que irão induzir a expressão de genes importantes para respostas inflamatórias (ARTHUR; LEY, 2013; BAYER; ALCAIDE, 2021). Culmina, dessa forma, em diversas respostas possíveis; entre elas, está a secreção de citocinas por células do sistema imune (CORRIN; NICHOLSON, 2011; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018; YANG; WANG; ANDERSSON, 2020; CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021).

1.3. Imunomodulação de macrófagos

Os macrófagos são células com notável plasticidade fenotípica, o que significa que eles respondem facilmente aos estímulos encontrados nos microambientes em que estão localizados, podendo desempenhar diferentes funções no processo inflamatório (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Existem duas subpopulações de macrófagos; os macrófagos M1, associados ao espectro de funções pró-inflamatórias, e os macrófagos M2, associados ao espectro de funções anti-inflamatórias; o fenômeno de diferenciação dessas células, para uma dessas subpopulações, é chamado de polarização de macrófagos (VERGADI *et al.*, 2017). Apesar da classificação M1 ou M2 ser superficial para explicar a verdadeira natureza da atividade dos macrófagos *in vivo* (visto que, por vezes, componentes pró-inflamatórios são encontrados em configurações M2, e vice-versa), esses termos são frequentemente usados para indicar o estado inflamatório de macrófagos do ponto de vista didático (RUSSELL; HUANG; VANDERVEN, 2019).

O processo pró-inflamatório envolve a ativação de macrófagos, tipicamente induzida por citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α , ou pelo reconhecimento de lipopolissacarídeos bacterianos (como LPS); esse processo é chamado de ativação clássica (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). A partir do momento em que são ativados, os macrófagos produzem e secretam muitas citocinas pró-inflamatórias, como: TNF- α , interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e ciclooxigenase-2 (COX-2) e até mesmo baixos níveis de IL-10 (citocina que contribui para polarização M2), participando ativamente da remoção de patógenos por meio do sistema de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase (NADPH) e de subsequente

produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) (HO; WANGENSTEEN; BARSETT, 2017; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Outras enzimas também participam do processo pró-inflamatório, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que produz óxido nítrico (NO) e desenvolve um papel vital na defesa do hospedeiro, visto que essa molécula possui efeito citotóxico sobre bactérias, vírus e células tumorais (HO; WANGENSTEEN; BARSETT, 2017). Em macrófagos, o NADPH2 formado é utilizado para produzir radicais superóxidos do oxigênio entre outras EROs, como o ânion superóxido (O_2^-), importantes para promover a morte de microrganismos; durante o processo de fagocitose, os macrófagos elevam o consumo de oxigênio para suprir essa via e eliminar o microrganismo invasor (ORIHUELA; MCPHERSON; HARRY, 2016). Para evitar danos teciduais crônicos produzidos por uma contínua estimulação pró-inflamatória, os macrófagos são polarizados para a configuração M2, associado ao espectro de funções anti-inflamatórias, voltados para o reparo tecidual, induzido pela ativação alternativa dessas células (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017). Os macrófagos no estado M2 são induzidos por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, por meio da via de ativação do fator de ativação da transcrição e transdutor de sinal 6 (STAT6) pelo receptor de IL-4 α (IL4-R α). Outras citocinas, como IL-10, também podem polarizar os macrófagos para configuração M2, com base na via fator de ativação da transcrição e transdutor de sinal 3 (STAT3) por meio dos receptores de IL-10 (IL-10R) (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). O estado M2 dos macrófagos é frequentemente associado com a geração de produtos anti-inflamatórios, como glicocorticoides, IL-10, IL-13 e fatores estimuladores de colônia 1 (CSF-1, também conhecido como M-CSF). A arginase 1 é uma enzima presente no citosol de macrófagos; ela influencia a resposta imunológica de diferentes maneiras, de forma que o aumento de sua atividade em macrófagos está associado às funções anti-inflamatórias devido à produção de espermina que irá reduzir a resposta pró-inflamatória de TNF-alfa e pela competição pelo substrato L-arginina com a enzima iNOS, reduzindo a produção de NO (HANNEMANN *et al.*, 2019; ORECCHIONI *et al.*, 2019). Porém, observar o estado M2, apenas como uma contraparte do estado M1, seria simplificar demais suas propriedades biológicas complexas (RUSSELL; HUANG; VANDERVEN, 2019).

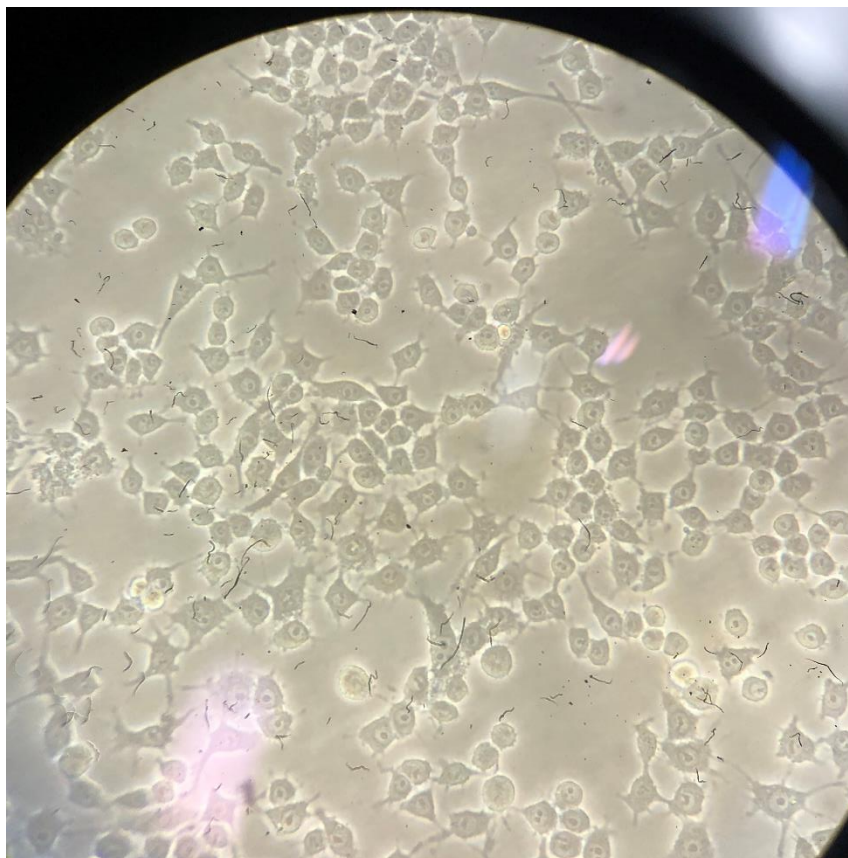


Figura 2 Fotografia de cultura celular de macrófagos de linhagem RAW 264.7 cultivados no Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste.

Nesse contexto, o uso de células de linhagem imortalizadas representa um importante instrumento de pesquisa para análises *in vitro* (BARDI; SMITH; HOOD, 2018; LATEGAN *et al.*, 2018; MAKOLA *et al.*, 2020), especialmente os monócitos/macrófagos da linhagem RAW 264.7 (figura 2), que permanecem estáveis durante diversas passagens (TACIAK *et al.*, 2018). Considerando que muitas espécies, pertencentes ao gênero *Lonchocarpus*, apresentam atividades imunomodulatórias e que alguns autores já estudaram a *L. cultratus* com foco em sua influência sobre a atividade inflamatória, é importante aumentar o entendimento acerca da influência exercida pelo extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* sobre a atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória de macrófagos, bem como é preciso avaliar o efeito do extrato sobre as vias intracelulares também relacionadas ao processo inflamatório.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos imunomodulatórios do extrato metanólico da raiz de *L. cultratus* sobre macrófagos de linhagem *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

Quantificar a produção de óxido nítrico, dosar a atividade de arginase e avaliar o efeito sobre a produção de ânion superóxido em macrófagos de linhagem RAW 264.7, quando submetidos ao tratamento com o extrato metanólico de *L. cultratus*, por meio de técnicas espectrofotométricas.

Dosar citocinas envolvidas com o processo inflamatório, como TNF- α e IL-10, em macrófagos de linhagem RAW 264.7 por meio de técnicas de ensaio de imunoabsorção enzimática.

Analisar as vias de sinalização por meio da metodologia de *Western Blotting*, utilizando anticorpos primários contra componentes intracelulares relacionados à atividade inflamatória de macrófagos de linhagem RAW 264.7, quando submetidos ao tratamento com o extrato metanólico da raiz de *L. cultratus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unioeste, sob o protocolo nº 28/19, intitulado “Avaliação do efeito e mecanismo de extratos de *Lonchocarpus cultratus* sobre macrófagos de linhagem RAW 264.7 e J774 e macrófagos peritoneais de camundongos”, sob a responsabilidade de Rafael Andrade Menolli, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica; encontra-se aprovado para execução, o qual está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo CEUA da Unioeste, em reunião de 16/08/2019 (Anexo I).

3.2. Obtenção do extrato de *Lonchocarpus cultratus*

Neste trabalho, foi utilizado o extrato metanólico da raiz de *L. cultratus*, que, por sua vez, já foi objeto de estudo do grupo de Pesquisas Fitoquímicas do Programa de Ciências Farmacêuticas (PCF) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), (GRIEBLER, 2017; BORTOLUZZI *et al.*, 2021; GRIEBLER *et al.*, 2021).

Os espécimes utilizados neste trabalho foram as raízes da planta *Lonchocarpus cultratus*, coletadas às margens do Lago Municipal Paulo Gorski, em Cascavel no Paraná (S 24.96308° e O 53.43674°), em abril de 2014. A identificação dos espécimes foi realizada pela bióloga sistemata da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Dra. Livia Godinho Temponi, identificando como *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H. C. Lima. Na ocasião da coleta, os pesquisadores que obtiveram os materiais vegetais (Grupo de Pesquisas Fitoquímicas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná) também confeccionaram uma exsicata, que está depositada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná: UNOP N° 20. A obtenção do extrato foi realizada após a secagem das raízes em estufa de ar circulante a 40 °C, passando pela etapa de trituração com moinho de facas do tipo *Wiley*. Na sequência, o material foi pesado e submetido a sucessivas extrações com diferentes solventes. Primeiramente, foi realizada a maceração e extração com o solvente hexânico, para obter o extrato hexânico da raiz de *L. cultratus* (LHR); com o

resíduo gerado nessa etapa, foi feito novamente o mesmo processo, porém, com o solvente diclorometano, para obter o extrato diclorometano da raiz de *L. cultratus* (LDR). Por fim, o resíduo gerado na etapa anterior foi submetido à maceração e extração com o solvente metanol, obtendo-se, então, o extrato metanólico da raiz de *L. cultratus* (LMR) (GRIEBLER, 2017). O fluxograma, apresentado na Figura 3, mostra as etapas para obtenção dos diferentes extratos da raiz de *Lonchocarpus cultratus*.

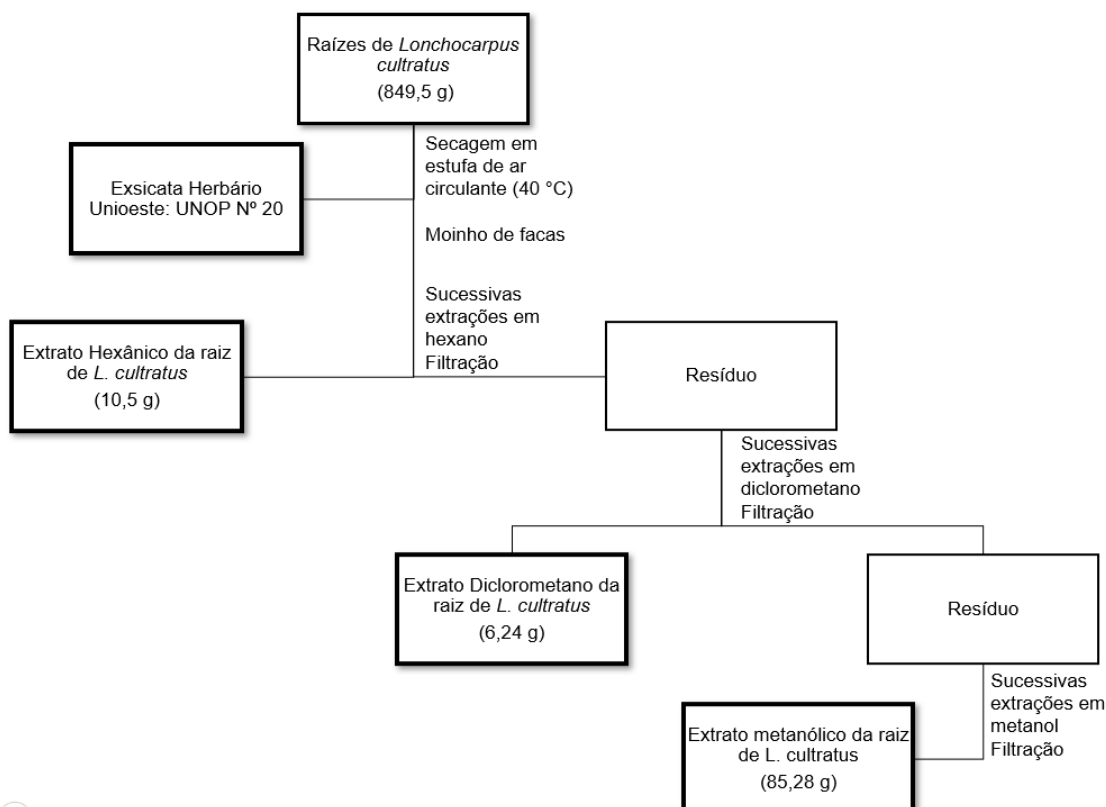


Figura 3 Obtenção do extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* (adaptado de Bortoluzzi *et al.*, 2021).

O extrato bruto foi armazenado no Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste em freezer na temperatura de -20 °C. Para sua utilização, foi preparada uma solução mãe, diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) (*Synth*, Diadema, São Paulo, Brasil) na concentração de 40 mg/mL. A partir dessa solução mãe, foi preparada uma diluição com meio de cultura (podendo ser em DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Gibco® nos experimentos envolvendo células RAW 264.7), na concentração de 175 µg/mL e, então, esterilizado com base no sistema de filtração a vácuo com membrana de 0,22 µm de diâmetro.

3.3. Cultura dos macrófagos de linhagem RAW 264.7

As células RAW 264.7, aqui utilizadas, foram cultivadas em meio DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Laborclin*, Pinhais, Paraná, Brasil) e antibióticos benzilpenicilina potássica a 100 UI/mL (*Blau Farmacêutica*, Cotia, São Paulo, Brasil) e estreptomicina a 100 µg/mL (*Vitalfarma*, São Sebastião do Paraíso, Minas Gerais, Brasil) (LIN *et al.*, 2003); foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular até atingirem aproximadamente 80% de confluência; nesse momento, o sobrenadante da cultura celular foi descartado e, em seguida, adicionado meio para desfazer a adesão das células da garrafa, utilizando o raspador de células (*cell-scraper*). Então, foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rotações por minuto (RPM) (centrífuga *Hettich Rotanta/RPC*, Tuttlingen, Alemanha). Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* celular foi suspenso novamente em 1 mL de meio DMEM e, então, foi realizada a contagem celular para a padronização da densidade celular a ser utilizada nos diferentes ensaios citados a seguir.

A padronização do inóculo foi realizada por meio da contagem celular, usando a câmara de Neubauer e microscópio óptico (*Olympus CBA*, Shinjuku, Tóquio, Japão). Primeiramente, contou-se o número total de macrófagos nos quatro quadrantes laterais da câmara e dividido por 4 (média dos quadrantes laterais). Então, esse número foi multiplicado pelo fator de diluição (fator 10), de maneira que foi multiplicado por 10.000 (fator associado às dimensões físicas da própria câmara). O resultado obtido correspondeu ao número de células por mL, dado utilizado para padronização da suspensão celular considerada para o inóculo no cultivo e experimentos (LIN *et al.*, 2003).

Após 12 a 18 horas de incubação e aderência das células no fundo da placa, o sobrenadante de cultivo foi descartado, os poços lavados com tampão fosfato salina (PBS) morno estéril e incubadas com os diferentes tratamentos, conforme citado na Tabela 1. O estímulo pró-inflamatório utilizado para a maioria dos experimentos foi o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O127:B8 (*Sigma*, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América); a exceção foi com a metodologia para dosagem do ânion superóxido. Nesses experimentos, foi utilizado o forbol miristato acetato (PMA) como controle pró-inflamatório. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -20 °C para dosagem de mediadores imunes. O lisado

celular foi utilizado para a análise das vias de sinalização envolvidas e, também, alguns marcadores do processo pró-inflamatório e anti-inflamatório.

Tabela 1 Tratamentos utilizados com as diferentes linhagens celulares.

Tratamento	Função
Meio de Cultura	Controle negativo
LPS 0,1 µg/mL ou PMA 5 µg/mL	Controle do estímulo pró-inflamatório
DMSO 0,6%	Controle do solvente
Extrato metanólico da raiz de <i>L. cultratus</i> 175 µg/mL	Avaliar o efeito do extrato sobre os macrófagos
Extrato metanólico da raiz de <i>L. cultratus</i> 175 µg/mL + LPS 0,1 µg/mL ou PMA 5 µg/mL	Avaliar possível interferência do extrato sobre o macrófago quando estimulado com LPS

3.4. Quantificação do óxido nítrico

A metodologia utilizada para quantificação do óxido nítrico (NO) foi a reação de Griess, para quantificar a presença dessa substância no sobrenadante de cultura das linhagens celulares, seguindo a metodologia descrita por Green e colaboradores (GREEN *et al.*, 1982).

O método colorimétrico de Griess é um dos mais utilizados para quantificação *in vitro* do NO, de maneira que provê uma detecção por meio da leitura de nitrito, nitrato e “agentes nitrosantes”, como um indicador para a produção NO. A reação de diazotização de dois passos está ilustrada na Figura 4. Primeiro, há o trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), o qual é obtido a partir do nitrito acidificado (originados da autooxidação de NO), que reage com sulfanilamida para formar um derivado chamado ácido diazobenzenosulfônico. Esse derivado interage com N-(1-naftil)-etilenodiamina para produzir o produto diazo de coloração roxa (ácido azo-alfa-aminonaftaleno-parabenzeno-sulfônico), o qual exibe forte absorbância a 540 nm.

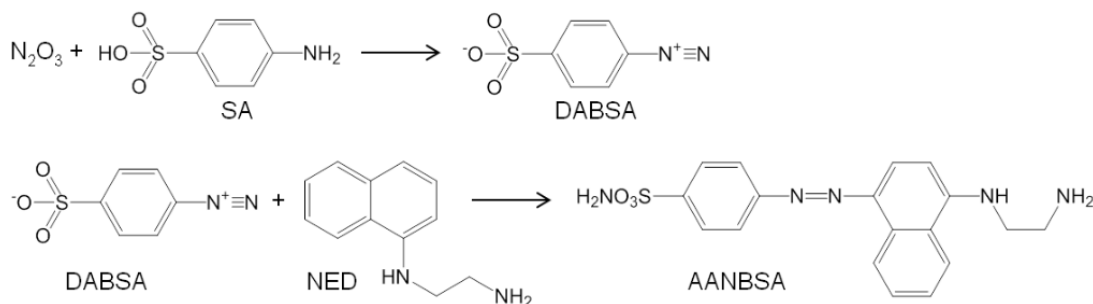


Figura 4 Reação química do ensaio de Griess. N₂O₃ (trióxido de dinitrogênio); SA (sulfonamida); DABSA (ácido diazobenzenosulfônico); NED (N-(1-naftil)-etilenodiamina); AANBSA (ácido azo-alfa-aminonaftaleno-parabenzeno-sulfônico) (adaptado de Zhou *et al.*, 2019).

Primeiramente, foi definida uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) em placa de 96 poços nas concentrações 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μmol/L, pipetadas em triplicata de 100 μL cada. Depois de adicionado o padrão, o ensaio foi realizado pipetando 100 μL dos sobrenadantes da cultura dos macrófagos (coletados conforme o item 3.2), em seus respectivos poços da placa de 96 poços e incubados com o mesmo volume de reativo de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% N-(1-naftil)-etilenodiamina dicloridrato/2,5 H₃PO₄) por 10 minutos em temperatura ambiente, para a estabilização do produto formado (composto azo); então, realizou-se a leitura no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro UV/Vis com leitor de microplacas (*Biotek Epoch Spectrophotometer*, Winooski, Vermont, Estados Unidos da América), usando o software *Biotek Gen5 Data Analysis*. Os dados brutos obtidos a partir das leituras foram plotados no software *Microsoft Excel* e tratado com o software *GraphPad Prism 6.0*.

3.5. Dosagem de ânion superóxido

A quantificação da produção de ânion superóxido pelos macrófagos foi feita por meio da metodologia descrita por Nishikimi e colaboradores (NISHIKIMI; APPAJI RAO; YAGI, 1972).

Inicialmente, foi necessário preparar os tratamentos a serem utilizados conforme a Tabela 1, porém, no lugar do LPS, utiliza-se o forbol miristato acetato 5 μg/mL (PMA) como controle positivo para a produção de ânion superóxido. O inóculo celular utilizado nesta metodologia foi de 200 μL de uma suspensão de 2,0 x 10⁵ células/poço. Após a aderência, o sobrenadante dos macrófagos foi retirado, os poços foram lavados com PBS estéril a 37 °C e adicionados os diferentes tratamentos, de

forma que o controle negativo foi utilizado apenas como meio de cultura e o tempo de tratamento é de 1 hora em estufa a 37 °C com 5% CO₂. Na sequência, a placa é centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos, lavada com aspirado o sobrenadante, lavado com PBS e adicionados os reagentes para revelação. Para isso, são adicionados 120 µL de hidróxido de potássio (KOH) junto com 140 µL de DMSO, incubados por 30 minutos e, então, o sobrenadante; foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/Vis com leitor de microplacas no comprimento de onda de 550 nm. Os resultados são expressos em porcentagem relativa ao controle negativo (será considerado 100%), plotados no software *Microsoft Excel* e tratados com o software *GraphPad Prism 6.0*.

3.6. Dosagem da atividade de arginase

A dosagem da atividade de arginase foi realizada como descrito pela metodologia de Corraliza e colaboradores (CORRALIZA *et al.*, 1994), no lisado do cultivo celular.

O inóculo celular utilizado nessa metodologia foi de 1000 µL de uma suspensão de $5,0 \times 10^5$ células/poço em placa de 24 poços. Após a aderência celular, o sobrenadante dos macrófagos foi retirado, lavado com PBS e adicionados os diferentes tratamentos, conforme a Tabela 1. Inicialmente, o sobrenadante do tratamento foi aspirado e as células aderidas no poço foram lisadas com 0,1% Triton X-100 e agitadas por 30 minutos em agitador tipo Kline. Posteriormente, foi adicionado tampão contendo 25 mM Tris-HCl e 5 mM de MnCl₂ para manutenção do pH em 7,4; em seguida, o lisado celular foi transferido para um microtubo de centrifugação onde ocorreram as reações subsequentes. As amostras foram aquecidas por 10 minutos em banho-seco a 56 °C para ocorrer a ativação da enzima. Após essa etapa, 25 µL do lisado celular foi transferido a um novo microtubo e incubado com 25 µL de arginina 0,5 mol/L para a reação de hidrólise durante 60 minutos em banho seco a 37 °C. Então, a reação foi interrompida pela adição de 400 µL de H₂SO₄:H₃PO₄:H₂O 1:3:7 (v/v) e, após incubação com 25 µL de 9% isonitrosopropiofenona e aquecidas a 100 °C por 45 minutos, a ureia produzida foi mensurada em espectrofotômetro UV/Vis com leitor de microplacas no comprimento de onda de a 540 nm. Os resultados são expressos em porcentagem relativa ao controle branco (considerado 100% de atividade de arginase), plotados no software *Microsoft Excel* e, por fim, tratado com o software *GraphPad Prism 6.0*.

3.7. Dosagem de citocinas

As dosagens de citocinas foram realizadas pela técnica de ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*) com kits comerciais Peptotech® (*Thermo Fisher Scientific*, Cranbury, Nova Jérsei, Estados Unidos da América) com amostras de sobrenadante da cultura celular de macrófagos (descrito no item 3.2), utilizando microplacas de alta ligação de 96 poços (*Sigma-Aldrich*, San Luis, Missouri, Estados Unidos da América). Entre as citocinas dosadas, estão o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interleucina 10 (IL-10).

3.8. Análise das vias de sinalização

Para análise das vias, macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados na densidade celular de 2×10^6 células/poço em placa de cultura celular de 6 poços e incubados por 12 a 18 horas para adesão celular. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os diferentes tratamentos, conforme Tabela 1, foram adicionados. Após 30 minutos de tratamento, o sobrenadante foi retirado e adicionado tampão RIPA para o rompimento celular; então, foi realizada a dosagem de proteína. A seguir, o equivalente a 20 μ g de proteínas dos lisados de macrófagos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%. As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra e incubadas em banho seco por 5 minutos a 95 °C e aplicadas no gel de poliacrilamida-SDS. A separação das proteínas foi feita em cuba de eletroforese (tampão de corrida: Triss 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,5%) a 125 V por aproximadamente 120 minutos. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%), a 90 mA durante 90 minutos. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução de leite desnatado (5%), em tampão Tris-salina (TBS)-Tween, durante 1 hora para minimizar as ligações inespecíficas, incubadas com anticorpo primário na diluição de 1:1000, durante 15 a 18 horas, sob agitação a 4 °C, e com anticorpo secundário durante 2 horas na diluição de 1:20000. A cada etapa de incubação, a membrana foi lavada com TBST, durante 5 minutos, por 3 vezes consecutivas. Como anticorpos primários, foram utilizados anti-phospho ERK $\frac{1}{2}$. Os anticorpos anti-mouse GAPDH (*Cell Signaling*

Technology, Danver, Massachusetts, Estados Unidos da América) foram utilizados para normalização dos valores adquiridos com os anticorpos primários; como anticorpo secundário, foi utilizado HRP-conjugado anti-IgG de cabra (*Abcam*, Cambridge, Reino Unido). A revelação foi realizada baseada na técnica de quimiluminescência, utilizando ECL (*Enhanced Chemiluminescence* – ECL; Amersham, Arlington Heights, Illinois, Estados Unidos da América); no equipamento *Chemi L-Pix Express* fotodocumentador (Locus Biotecnologia, São Paulo, São Paulo, Brasil), a densidade relativa da banda foi analisada pelo software *Image Studio Lite Versão 5.2*.

3.9. Análise estatística

As características dos experimentos realizados e os dados gerados consistem em variáveis quantitativas contínuas e obtidos por meio de amostras independentes, o que guiou a escolha dos testes estatísticos a serem utilizados. Como medida de tendência central para caracterizar os dados dos diferentes tratamentos, utilizamos a média aritmética simples; para descrever a dispersão dos dados, empregamos o desvio padrão. O passo seguinte foi avaliar se os conjuntos de dados apresentavam uma distribuição normal (para, então, guiar a escolha de testes paramétricos ou não paramétricos). O teste de Shapiro-Wilk demonstrou que os dados dos experimentos assumiram distribuição normal (gaussiana), permitindo o uso de testes paramétricos. A Tabela ANOVA foi utilizada para avaliar se havia diferenças entre os diferentes tratamentos e o teste de múltiplas comparações foi empregado para discriminar tais diferenças. O nível de significância considerado foi de 5% (a diferença estatística existiu quando $p\text{-valor} < 0,05$). Os dados brutos foram plotados usando o software *Microsoft Excel* e as análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism versão 6.0*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme publicações anteriores, extratos das raízes e das sementes de *L. cultratus* possuem a capacidade de inibir promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, apresentando uma atividade antiparasitária (GRIEBLER *et al.*, 2021; STAFFEN *et al.*, 2022), mas permanece incerto se o efeito ocorre diretamente sobre os parasitas ou se extratos de *Lonchocarpus cultratus* apresentam a habilidade de modular as células envolvidas na eliminação desses parasitas.

O extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* foi objeto de estudo em trabalhos prévios do Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste. Os ensaios para avaliar sua citotoxicidade foram realizados por Griebler e colaboradores (GRIEBLER, 2017) e, também, por Staffen e colaboradores (STAFFEN; MENOLLI; AYALA, 2020), por meio da metodologia descrita por Mosmann com modificações, utilizando o brometo de 3-metil-[4-5-8-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). Esses autores trabalharam com o extrato desde a concentração de 1 µg/mL até 175 µg/mL e, mesmo na maior concentração, o extrato não demonstrou citotoxicidade em células de macrófagos de linhagem RAW 264.7 e macrófagos peritoneais de *Mus musculus* BALB/c, apresentando uma concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) superior a 300 µg/mL. Esse fator nos levou a priorizar o trabalho com o extrato na concentração de 175 µg/mL.

4.1. O efeito do LMR na produção de óxido nítrico pelos macrófagos

A quantificação da produção de NO foi a primeira etapa de experimentos desenvolvida, de modo a avaliar a influência do extrato sobre a atividade pró-inflamatória dos macrófagos.

Um importante aspecto, relacionado à produção de NO, é que essa molécula possui um precursor metabólico para sua produção, a L-arginina; esse aminoácido é convertido em L-Citrulina pela iNOS (E.C.: 1.14.13.39), uma enzima encontrada em macrófagos que têm sua expressão aumentada durante processos inflamatórios, gerando também NO (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; GOSHI; ZHOU; HE, 2019). O NO é um gás instável, altamente lipofílico e consiste em uma molécula de radical livre que possui elétron não-pareado; devido a essa natureza, o NO é prontamente oxidado em nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), sendo muito difícil sua

quantificação direta *in vivo*, de maneira que é frequentemente dosado indiretamente por meio de seus produtos, como nitrito e nitrato (GOSHI; ZHOU; HE, 2019).

A partir da dúvida levantada sobre a influência de LMR a respeito da atividade celular de macrófagos, foi avaliado o efeito do extrato sobre a produção e secreção de NO de macrófagos da linhagem RAW 264.7, quando estimulados com os diferentes tratamentos por um período de 24 horas, usando LMR na concentração de 175 $\mu\text{g/mL}$, conforme demonstrado na Figura 5.

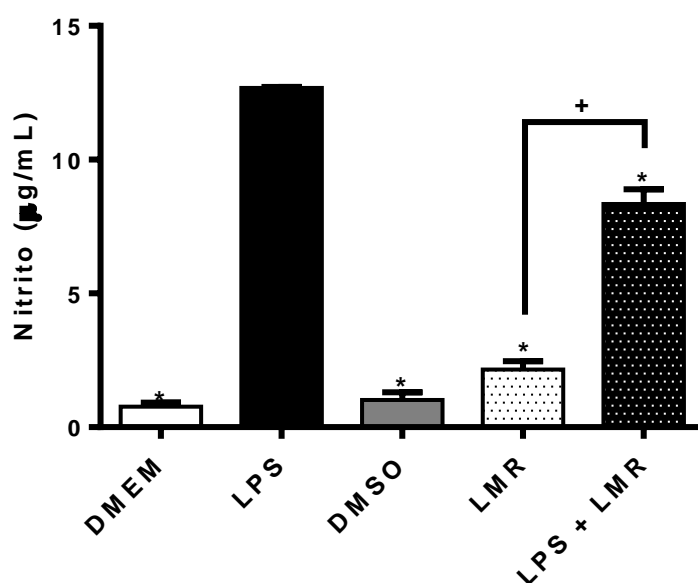


Figura 5 Secreção de óxido nítrico por células de linhagem RAW 264.7 após tratamento com extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* 175 $\mu\text{g/mL}$ (LMR). Os valores representam a média aritmética \pm desvio padrão. N=3. *p < 0,05 vs LPS; +p < 0,05 vs LPS + LMR.

A tabela ANOVA dos dados apresentados na figura anterior demonstrou que existiu diferença entre os tratamentos utilizados para avaliação da influência sobre a produção de NO por macrófagos de linhagem RAW 264.7 (p-valor < 0,001). O teste de múltiplas comparações evidenciou que o controle LPS estimulou significativamente a produção de NO, quando comparado com os demais tratamentos. Isoladamente, o LMR não apresentou produção significativa de NO (na comparação DMEM vs LMR o p-valor foi 0,0691); além disso, o LMR demonstrou ser capaz de atenuar a produção de NO quando tratado concomitantemente com LPS (na comparação LMR com LPS + LMR o p-valor foi < 0,0001). Esse fato já havia sido observado por outros pesquisadores (STAFFEN; MENOLLI; AYALA, 2020) e, considerando que Magalhães e colaboradores já evidenciaram a presença de alcaloides na espécie *L. cultratus*

(MAGALHÃES *et al.*, 2002), essa atenuação era esperada, visto que alcaloides possuem a capacidade de promover ações anti-inflamatórias (ZHOU *et al.*, 2022). Portanto, é possível observar que a iNOS foi menos estimulada para a produção de NO, quando tratada com o extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus*. As células tratadas com o controle do solvente (DMSO 0,6%) não apresentaram produção significativa de NO (na comparação DMEM com DMSO o p-valor foi de 0,1612).

4.2. Influência do LMR sobre a produção de ânion superóxido

Dando sequência às análises de EROs, foi realizada a dosagem de ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- é uma importante molécula para o combate de microrganismos (IMLAY, 2019) e possui diversas origens, principalmente devido ao fato de que a redução univalente do O_2 ao O_2^- é um processo muito facilitado e pode ser produzido pelas enzimas NADPH oxidases em todos os tipos celulares que participam da inflamação (FRIDOVICH, 1997); existem ainda outras fontes, que podem ser as próprias isoenzimas de NOS (óxido nítrico sintases) quando na ausência de alguns cofatores, como a tetrahydrobiopterina (BH_4), pois, ao invés de produzirem NO, elas acabam produzindo ânion superóxido (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003).

A Figura 6 mostra o efeito do extrato LMR na concentração de $175 \mu\text{g/mL}$ sobre a produção de O_2^- de macrófagos da linhagem RAW 264.7, quando estimulados com os diferentes tratamentos por um período de 24 horas.

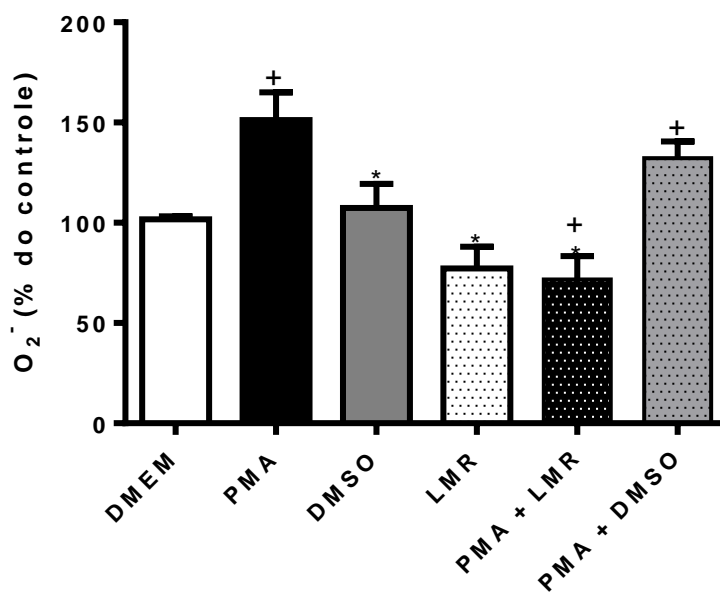


Figura 6 Produção de ânion superóxido por macrófagos de linhagem RAW 264.7 após tratamento com extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* durante o tratamento de 24 horas. Controle negativo: meio DMEM; forbol miristato acetato 10 µg/mL; ácido dimetilssulfóxido 0,6% em meio DMEM; LMR: extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* 175 µg/mL. Os valores representam a média ± desvio padrão. N = 3. *p-valor < 0,05 vs PMA; + p-valor <0,05 vs DMEM.

Isoladamente, o extrato LMR não apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao controle DMEM, no entanto, quando LMR é combinado com PMA, essa diferença existiu (p-valor = 0,0352), evidenciando a tendência que o extrato possui em atenuar a atividade pró-inflamatória de macrófagos em todos os tratamentos em que o extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* estavam presentes. Dessa forma, houve uma discreta redução na produção de O₂⁻ em relação ao tratamento contendo apenas meio de cultura. Em conjunto com os dados da dosagem de NO, o LMR na concentração de 175 µg/mL parece interferir nas vias de produção das EROs. A análise ANOVA demonstrou que houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos aplicados (p-valor < 0,0001). O controle positivo utilizado no experimento PMA funcionou adequadamente (p-valor de 0,0009 quando comparado ao controle DMEM); o controle do solvente DMSO não apresentou diferença quando comparado ao controle DMEM. É possível observar que o LMR, quando combinado com PMA, produziu uma atenuação da produção de O₂⁻ muito maior do que DMSO, quando combinado com PMA (esta última não apresentou uma diferença significativa estatisticamente do tratamento contendo apenas PMA), evidenciando a inexistência de interferência do DMSO no experimento. Outras plantas exploradas na medicina popular, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e

antioxidantes, também demonstraram capacidade de atenuar a produção de ânion superóxido, quando utilizadas na forma de extrato metanólico (RUKSHALA *et al.*, 2021). Um tratamento testado apenas neste experimento foi o PMA combinado com o DMSO; é possível observar que o DMSO provou um ligeira redução na produção de O_2^- , no entanto, não demonstrou diferença significativa com o PMA isolado, portanto, o DMSO não exerceu influência nos resultados obtidos.

4.3. O LMR e o perfil anti-inflamatório através da atividade de arginase

A influência sobre o espectro anti-inflamatório foi avaliada, num primeiro momento, por meio da dosagem da atividade de arginase no lisado celular da cultura celular dos macrófagos RAW 264.7. A arginase (E.C.: 3.5.3.1) é uma enzima conhecida por catalisar a conversão de L-arginina em L-ornitina e ureia. O substrato L-arginina é compartilhado tanto pela arginase como a iNOS (CORRALIZA *et al.*, 1994). O metabolismo de L-arginina pode ser modulado em direção à síntese de L-ornitina, catalisado pela enzima arginase. Os produtos subsequentes de L-ornitina, como poliaminas e L-prolina, estão envolvidos no crescimento celular, síntese de colágeno e cicatrização. Portanto, a arginase e a iNOS são enzimas que catalisam um substrato comum, mas produzem efeitos biológicos divergentes. Essas enzimas são conhecidas por serem funcionalmente competitivas devido ao fato de que, ao estimular uma enzima, a outra será regulada negativamente devido ao limite de disponibilidade do mesmo substrato. Esses dois processos metabólicos podem refletir em diferentes estágios funcionais de macrófagos. É bem conhecido que macrófagos podem ser ativados pela via clássica ou pela via alternativa e, portanto, são referenciados como células inflamatórias ou anti-inflamatórias. Mediadores inflamatórios e citocinas induzem ativação clássica envolvendo a expressão de iNOS, enquanto citocinas anti-inflamatórias induzem a ativação alternativa, com o aumento da atividade de arginase (ZHAI *et al.*, 2009).

A Figura 7 mostra o efeito do extrato metanólico da raiz de *L. cultratus* na concentração de 175 $\mu\text{g/mL}$ sobre a atividade de arginase em macrófagos da linhagem RAW 264.7, quando estimulados com os diferentes tratamentos por um período de 24 e 48 horas, respectivamente.

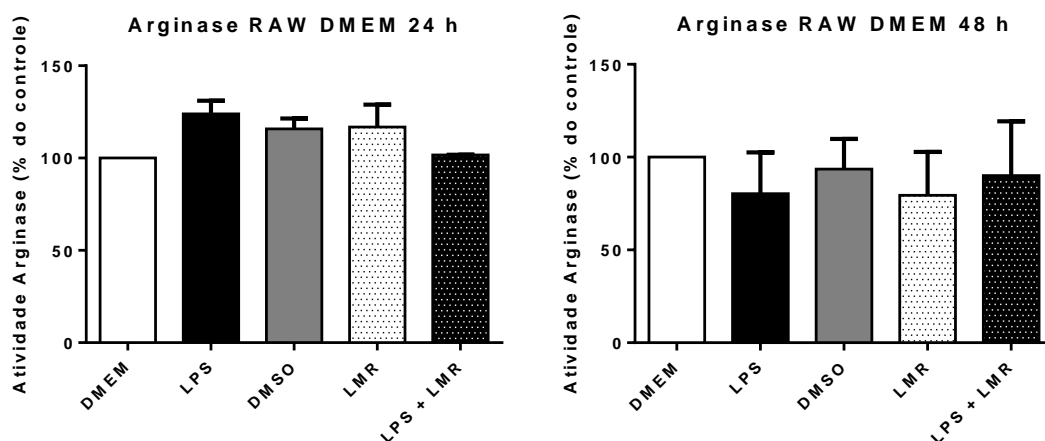


Figura 7 Atividade de arginase por macrófagos da linhagem RAW 264.7, após tratamento com extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* 175 µg/mL por 24 e 48 horas (respectivamente A e B). Os valores representam a média ± desvio padrão. N=5.

A análise ANOVA demonstrou que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos aplicados neste tratamento tanto na incubação de 24 horas quanto de 48 horas (p -valor = 0,1875 e p -valor = 0,9440, respectivamente) e, conseqüentemente, os testes de múltiplas comparações entre os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas (todos os p -valores > 0,05). Logo, o LMR não aumentou a atividade da arginase, portanto, com base nos experimentos realizados, não é possível afirmar que o extrato aumente a atividade anti-inflamatória dos macrófagos. Esses resultados não eram esperados, visto que outras espécies do gênero *Lonchocarpus* são popularmente utilizadas devido às suas propriedades anti-inflamatórias (PIRES *et al.*, 2019; MORIASI *et al.*, 2021), no entanto, é importante lembrar que a atividade de arginase corresponde apenas a uma fração do espectro anti-inflamatório e mais ensaios devem ser considerados antes de inferir sobre a atividade anti-inflamatória dos extratos.

4.4. Efeito do LMR na secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e é secretada em abundância pelos macrófagos mediante estímulos específicos. A Figura 8 mostra o efeito do extrato metanólico da raiz de *L. cultratus* na concentração de 175 µg/mL sobre a produção de TNF- α em macrófagos da linhagem RAW 264.7, quando estimulados com os diferentes tratamentos por um período de 24 horas.

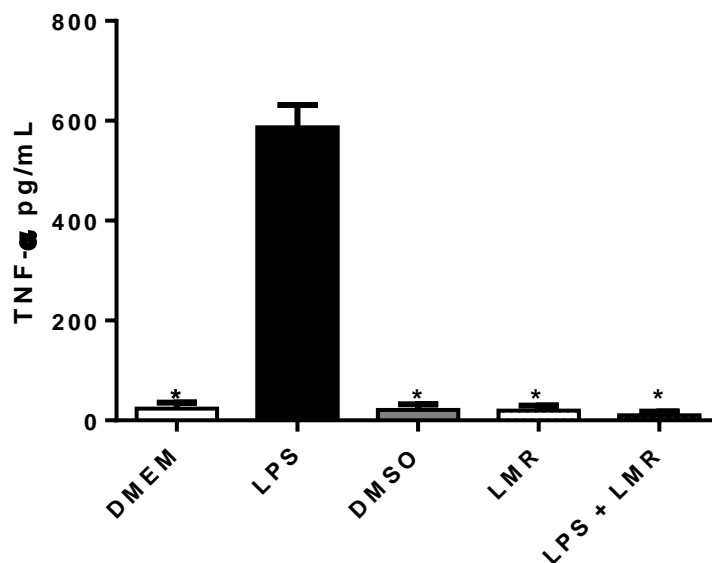


Figura 8 Produção de TNF- α por macrófagos da linhagem RAW 264.7, após tratamento com extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas. Os valores representam a média \pm desvio padrão. N = 4. * $p < 0,05$ vs LPS.

As células tratadas com o controle negativo (meio DMEM) e o controle do solvente (DMSO 0,6%) não apresentaram produção significativa de TNF- α , indicando que não houve interferência deles neste experimento. O extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* foi capaz de impedir a produção de TNF- α no tratamento simultâneo com LPS, evidenciando a tendência que o extrato possui em atenuar a resposta pró-inflamatória. Conforme observado por Bortoluzzi e colaboradores, a ressonância magnética nuclear de hidrogênio do extrato LMR apresenta metabólitos secundários da classe dos terpenos (BORTOLUZZI *et al.*, 2021). Guo e colaboradores observaram que compostos dessa classe possuem a característica de atenuar a produção de mediadores pró-inflamatórios, como NO e TNF- α (GUO *et al.*, 2019), concordando com os resultados obtidos neste experimento. A análise ANOVA demonstrou que houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos aplicados para avaliar a influência sobre a produção de TNF- α (p-valor $< 0,0001$). O controle pró-inflamatório utilizado (LPS 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostrou-se efetivo (p-valor $< 0,0001$ quando comparado ao controle DMEM).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina associada ao espectro de funções anti-inflamatórias. A Figura 9 mostra o efeito do extrato metanólico da raiz de *L.*

cultratus, na concentração de 175 µg/mL, sobre a produção de IL-10 em macrófagos da linhagem RAW 264.7, quando estimulados com os diferentes tratamentos por um período de 24 horas.

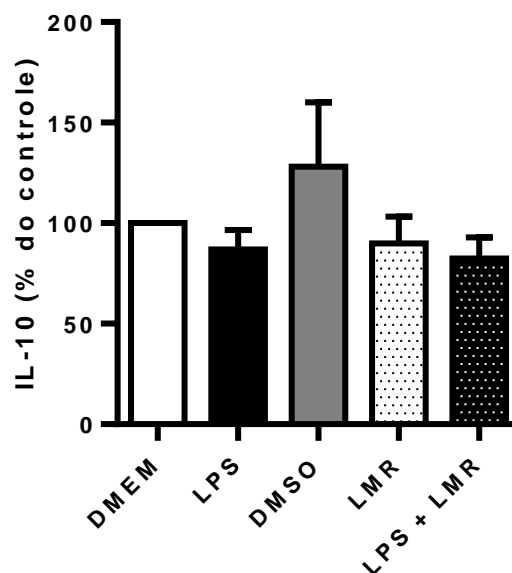


Figura 9 Produção de IL-10 por macrófagos da linhagem RAW 264.7, após tratamento com extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* 175 µg/mL por 24 horas. Os valores representam a média \pm desvio padrão. N = 3.

A análise ANOVA demonstrou que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos aplicados para avaliar a influência sobre a produção de IL-10 (p-valor = 0,3528) e, portanto, os testes de múltiplas comparações entre os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas (todos os p-valor > 0,05). Logo, o LMR não aumentou a produção de IL-10. De mesmo modo, conforme observado nos experimentos envolvendo a atividade de arginase, não é possível afirmar que o extrato aumente a atividade anti-inflamatória dos macrófagos, mas apenas atenua a resposta pró-inflamatória.

4.5. Efeito do LMR na via de sinalização do TLR4

Avaliamos o efeito do extrato na expressão da proteína fosforilada intracelular p-ERK $\frac{1}{2}$ (também chamada de p-ERK 44/42, devido aos seus respectivos pesos moleculares 44 e 42 kDa), que faz parte do conjunto de proteínas da via das MAPK, e estão envolvidas na via de sinalização mediada pelo TLR4. A fosforilação em pERK

$\frac{1}{2}$ promove ativação de fator nuclear de transcrição do kappa B (NF- κ B) e proteína ativadora de fator de transcrição 1 (AP-1), que irão regular a expressão de genes indutores da inflamação. A inibição da fosforilação de ERK 42/44 leva a uma diminuição na secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 (CATANZARO *et al.*, 2018).

A Figura 10 mostra o efeito de extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* sobre a via de sinalização das MAPK macrófagos de linhagem RAW 264.7, após 30 minutos de tratamento.

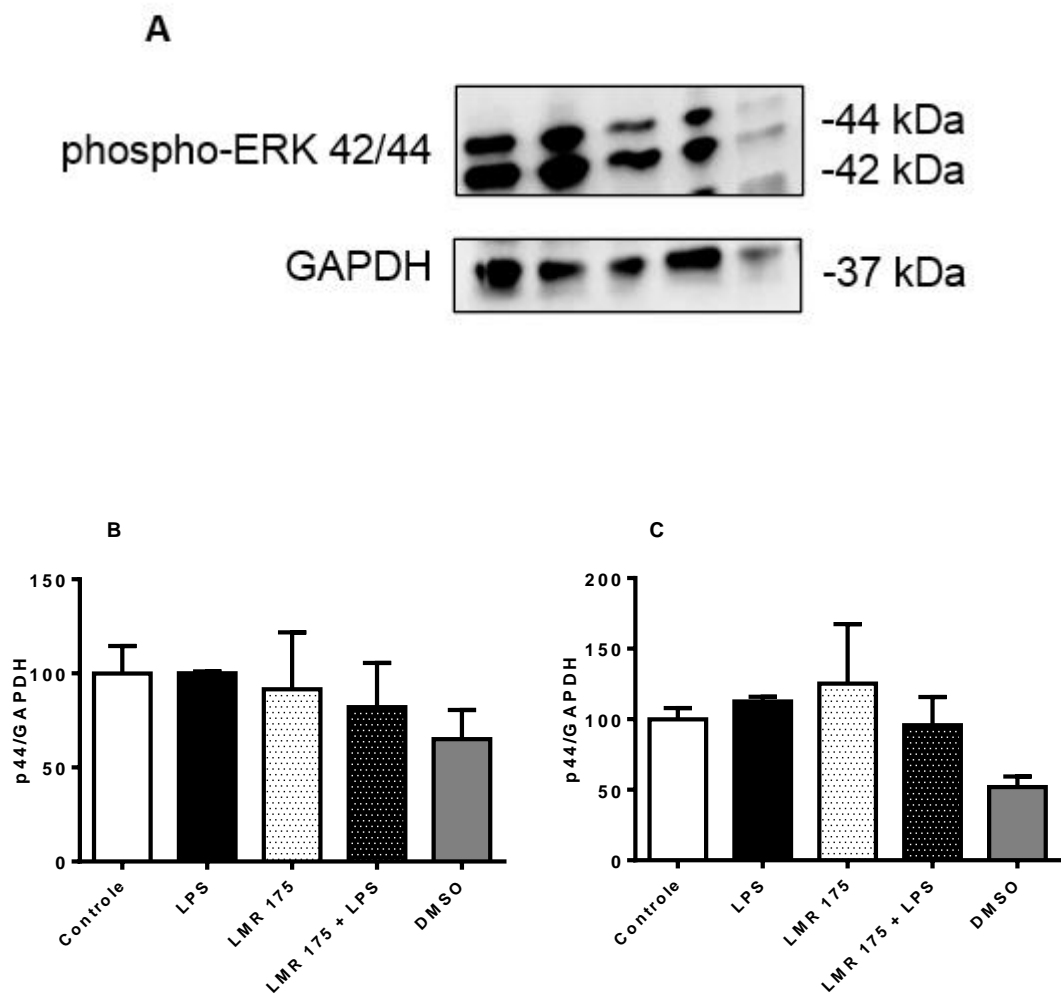


Figura 10 Efeito de extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* sobre a via de sinalização das MAPK macrófagos de linhagem RAW 264.7 após 30 minutos de tratamento. A) Membrana representativa do *Western Blot* sondada com anticorpos fosfo-ERK 44 e anti-GAPDH (37 kDa). B) Relação fosfo-ERK 42/GAPDH C) Relação fosfo-ERK 42/GAPDH. Os valores representam a média \pm desvio padrão. N=3.

O extrato de *L. cultratus* não foi capaz de produzir significativas mudanças na fosforilação da proteína pERK 42/44, após 30 minutos de estímulo. Apesar do extrato atenuar a resposta inflamatória (propriedade evidenciada nos experimentos de NO, O₂- e TNF-alfa), essa função ocorre em outras vias intracelulares que culminam na produção de mediadores pró-inflamatórios em MAPK diferentes de pERK 42/22 e que envolvem a NF-KB, por exemplo, JNK1/2/3, p38-MAPK e ERK5 (SUN *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2021).

5. CONCLUSÃO

De modo geral, observamos que o extrato metanólico da raiz de *Lonchocarpus cultratus* foi capaz de atenuar a atividade pró-inflamatória nos macrófagos da linhagem RAW 264.7 para a produção de diferentes compostos, como o NO, ânion superóxido e TNF- α . No entanto, não podemos afirmar que nosso objeto de estudo desloque o equilíbrio das funções celulares para o espectro anti-inflamatório, visto que ele não foi capaz de aumentar a atividade de arginase e produção de IL-10. É possível que o extrato interfira em outras vias intracelulares diferentes da via das MAPK pERK 44/42, que culminam na produção de mediadores pró-inflamatórios. Em suma, o extrato mostrou-se como um atenuador da produção de compostos pró-inflamatórios.

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	Semestre				
	2º/2020	1º/2021	2º/2021	1º/2022	2º/2022
Revisão bibliográfica e produção do pré-projeto	X				
Quantificação de óxido nítrico		X	X		
Dosagem de ânion superóxido		X	X	X	X
Cultivo celular		X	X	X	X
Dosagem atividade arginase		X	X		
Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-10 etc.)			X	X	X
Análise de vias de sinalização (<i>Western Blotting</i>)			X	X	
Análise estatística de dados		X	X	X	X
Produção da dissertação			X	X	X
Produção do artigo de revisão		X	X	X	X
Qualificação				X	
Defesa da dissertação					X

7. REFERÊNCIAS

- AMARANTE-MENDES, G. P. *et al.* Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. **Frontiers in Immunology**, São Paulo, v. 9, n. OCT, p. 1-19, outubro, 2018.
- ARTHUR, J. S. C.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, Winnipeg, v. 13, n. 9, p. 679-692, junho, 2013.
- BARDI, G. T.; SMITH, M. A.; HOOD, J. L. Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. **Cytokine**, Louisville, v. 105, n. 5, p. 63-72, maio, 2018.
- BAYER, A. L.; ALCAIDE, P. MyD88: At the heart of inflammatory signaling and cardiovascular disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Boston, v. 161, n. August, p. 75-85, agosto, 2021.
- BHUSAL, R. P.; FOSTER, S. R.; STONE, M. J. Structural basis of chemokine and receptor interactions: Key regulators of leukocyte recruitment in inflammatory responses. **Protein Science**, Clayton, v. 29, n. 2, p. 420-432, agosto, 2020.
- BOLZ, S. N.; ADASME, M. F.; SCHROEDER, M. Toward an Understanding of Pan-Assay Interference Compounds and Promiscuity: A Structural Perspective on Binding Modes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Dresden, v. 61, n. 5, p. 2248-2262, abril, 2021.
- BORGES-ARGÁEZ, R. *et al.* Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp. **Phytomedicine**, Yucatán, v. 14, n. 7-8, p. 530-533, fevereiro, 2007.
- BORTOLUZZI, A. A. M. *et al.* Determination of chemical structure and anti-Trypanosoma cruzi activity of extracts from the roots of *Lonchocarpus cultratus* (Vell.). AZEVEDO, A.M.G. e LIMA, H. C. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Cascavel, v. 28, n. 1, p. 99-108, jan. 2021.
- CATANZARO, M. *et al.* Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and Echinacea. **Molecules**, Bolonha, v. 23, n. 11, p. 1-17, setembro, 2018.
- CHAUHAN, D.; VANDE WALLE, L.; LAMKANFI, M. Therapeutic modulation of inflammasome pathways. **Immunological Reviews**, Gante, v. 297, n. 1, p. 123-138, junho, 2020.
- CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Varsóvia, v. 78, n. 4, p. 1233-1261, setembro, 2021.
- COILLARD, A.; SEGURA, E. In vivo differentiation of human monocytes. **Frontiers in Immunology**, Paris, v. 10, n. AUG, p. 1-7, agosto, 2019.
- CORRALIZA, I. M. *et al.* Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **Journal of Immunological Methods**, Cáceres, v. 174, n. 1-2, p. 231-

235, setembro, 1994.

CORRIN, B.; NICHOLSON, A. G. **The structure of the normal lungs**. 8. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2011.

CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochemical Journal**, Madri, v. 429, n. 3, p. 403-417, junho, 2010.

DA SILVA LANDIM, E. M. B. M. *et al.* Antiproliferative activity and chemical constituents of *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). **Natural Product Research**, Maringá, v. 0, n. 0, p. 1-4, agosto, 2019.

DA SILVA, M. J.; TOZZI, A. M. G. de A. Revisão taxonômica de *Lonchocarpus* s. str. (Leguminosae, Papilionoideae) do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Goiânia, v. 26, n. 2, p. 357-377, fevereiro, 2012.

DE LIMA, J. P. S. *et al.* In vivo antileishmanial activity of *annona mucosa* extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Manaus, v. 53, n. 139, p.1-5, outubro, 2020.

ESTRELA, J. M. *et al.* Polyphenolic Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy: Bioavailability versus Bioefficacy. **Journal of Medicinal Chemistry**, Valência, v. 60, n. 23, p. 9413-9436, junho, 2017.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. **Journal of Biological Chemistry**, Durham, v. 272, n. 30, p. 18515-18517, julho, 1997.

GLASS, C. K.; NATOLI, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. **Nature Immunology**, San Diego, v. 17, n. 1, p. 26-33, janeiro, 2016.

GOMBART, A. F.; PIERRE, A.; MAGGINI, S. A Review of Micronutrients and the Immune System—Working in Harmony to Reduce the Risk of Infection. **Nutrients**, Corvallis, v. 12, n. 1, p. 236, jan. 2020.

GOSHI, E.; ZHOU, G.; HE, Q. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. **Medical Gas Research**, Xangai, v. 9, n. 4, p. 192-207, novembro, 2019.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 131-138, fevereiro, 1982.

GRIEBLER, A. **Atividade Anti-Bacteriana e Anti-Trypanosoma cruzi de Extratos de Sementes de Lonchocarpus cultratus**. Profa. Dra. Tereza Cristina Marinho Jorge: . 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica em 2017) – Programa de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2017.

GRIEBLER, A. *et al.* Anti-Trypanosoma cruzi activity, cytotoxicity and, chemical characterization of extracts from seeds of *Lonchocarpus cultratus*. **Journal of Infection in Developing Countries**, Cascavel, v. 15, n. 2, p. 270-279, fevereiro, 2021.

GUO, D. Le *et al.* Terpene glycosides from *sanguisorba officinalis* and their anti-inflammatory effects. **Molecules**, Chengdu, v. 24, n. 16, p. 1-9, agosto, 2019.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Cracóvia, v. 54, n. 4, p. 469-487, abril, 2003.

HANNEMANN, N. *et al.* Transcription factor Fra-1 targets arginase-1 to enhance macrophage-mediated inflammation in arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, Xangai, v. 129, n. 7, p. 2669-2684, maio, 2019.12

HO, G. T. T.; WANGENSTEEN, H.; BARSETT, H. Elderberry and elderflower extracts, phenolic compounds, and metabolites and their effect on complement, RAW 264.7 macrophages and dendritic cells. **International Journal of Molecular Sciences**, Oslo, v. 18, n. 3, p. 1-17, março, 2017.

IMLAY, J. A. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? **Environmental microbiology**, Urbana, v. 21, n. 2, p. 521-530, fevereiro, 2019.

JASIAL, S.; HU, Y.; BAJORATH, J. How Frequently Are Pan-Assay Interference Compounds Active? Large-Scale Analysis of Screening Data Reveals Diverse Activity Profiles, Low Global Hit Frequency, and Many Consistently Inactive Compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, Bonn, v. 60, n. 9, p. 3879-3886, abril, 2017.

LATEGAN, K. *et al.* Effects of graphene oxide nanoparticles on the immune system biomarkers produced by RAW 264.7 and human whole blood cell cultures. **Nanomaterials**, Cidade do Cabo, v. 8, n. 2, p. 1-16, fevereiro, 2018.

LIN, H. Y. *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. **Biochemical Pharmacology**, Taipé, v. 66, n. 9, p. 1821-1832, maio, 2003.

LLOBERAS, J.; MODOLELL, M.; CELADA, A. L-Arginine and Macrophages: Role in Classical and Alternative Activation. **L-Arginine in Clinical Nutrition**. Barcelona: Springer International Publishing, 2017. p. 117-129.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998.

MAGALHÃES, A. F. *et al.* Detection of polyhydroxyalkaloids in *Lonchocarpus* extracts by GC-MS of acetylated derivatives. **Phytochemical Analysis**, Campinas, v. 13, n. 4, p. 215-221, novembro, 2002.

MAGALHÃES, A. F. *et al.* Flavonoids of *Lonchocarpus montanus* A.M.G. Azevedo and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Campinas, v. 79, n. 3, p. 351-367, fevereiro, 2007.

MAKOLA, R. T. *et al.* The Effect of Lithium on Inflammation-Associated Genes in Lipopolysaccharide-Activated Raw 264.7 Macrophages. **International Journal of Inflammation**, Sovenga, v. 2020, n. Nrf 2, p. 1-18, julho, 2020.

MCCOMB, S. *et al.* Introduction to the Immune System. **The Variation and Adaptive Expression of Antibodies**. [s.l.]: Springer, 2019. p. 1-24.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Palo Alto, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, junho, 1983.

NISHIKIMI, M.; APPAJI RAO, N.; YAGI, K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nagoia, v. 46, n. 2, p. 849-854, novembro, 1972.

ORECCHIONI, M. *et al.* Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, San Diego, v. 10, n. MAY, p. 1-14, maio, 2019.

ORIHUELA, R.; MCPHERSON, C. A.; HARRY, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. **British Journal of Pharmacology**, Durham, v. 173, n. 4, p. 649-665, março, 2016.

RUSSELL, D. G.; HUANG, L.; VANDERVEN, B. C. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. **Nature Reviews Immunology**, Nova Iorque, v. 19, n. 5, p. 291-304, maio, 2019.

SATTLER, S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. *In*: SOBRENOME, N. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.]: Sattler, 2017. p. 3-14.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. *et al.* **Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease**. **Journal of Cellular Physiology**, Mashhad, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, janeiro, 2018.

STAFFEN, I. V. *et al.* Chalcone-rich extracts from *Lonchocarpus cultratus* roots present in vitro leishmanicidal and immunomodulatory activity. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, Cascavel, v. 74, n. 1, p. 77-87, janeiro, 2022.

STAFFEN, I. V.; MENOLLI, R. A.; AYALA, T. S. **Avaliação das atividades leishmanicida, tripanocida e imunomoduladora de extratos de raízes de *Lonchocarpus cultratus***. Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli: . 2020. 92 f. Dissertação de mestrado em Farmácia – Programa de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2020.

SUN, Y. *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, Nanjing, v. 35, n. 6, p. 600-604, junho, 2015.

TACIAK, B. *et al.* Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **PLoS ONE**, Varsóvia, v. 13, n. 6, p. 1-13, junho, 2018.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of derriobtusone A isolated from *Lonchocarpus obtusus*. **BioMed Research International**, Fortaleza, p. 1-19, junho, 2014.

VERGADI, E. *et al.* Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. **The Journal of Immunology**, Creta, v. 198, n. 3, p. 1006-1014, janeiro, 2017.

YANG, H.; WANG, H.; ANDERSSON, U. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. **Frontiers in Immunology**, Yonsei, v. 11, n. March, p. 1-9, março, 2020.

ZHAI, Z. *et al.* Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells indicative of alternative macrophage activation. **J Ethnopharmacol**, Ames, v. 122, n. 1, p. 76-85, fevereiro, 2009.

ZHOU, Y. *et al.* Purification, structural characterization and immunomodulatory effects of polysaccharides from amomum villosum lour. On raw 264.7 macrophages. **Molecules**, Cantão, v. 26, n. 9, p. 1-21, maio, 2021.

8. ANEXOS

8.1. Anexo I



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Autorização

O Protocolo nº 28/19 intitulado “**Avaliação do efeito e mecanismo de extratos de *Lonchocarpus cultratus* sobre macrófagos de linhagem RAW 264.7 e J774 e macrófagos peritoneais de camundongos**”, sob a responsabilidade de **Rafael Andrade Menolli** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 16/08/2019. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	16/08/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico - Balb/c
N. de animais	288
Peso/Idade	8-12 semanas - 25 gramas
Sexo	Masculino (144) e feminino (144)
Origem	Biotério da Unioeste.

Cascavel, 29/08/2019.

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña

Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3126/2018-GRE