



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

AVALIAÇÃO DA 7-HIDROXIFLAVONA COMO POTENCIAL AGENTE IMUNOMODULADOR EM LINFÓCITOS HUMANOS E MURINOS ATIVADOS

VANESSA DA SILVA OLIVEIRA

**Salvador
2025**

AVALIAÇÃO DA 7-HIDROXIFLAVONA COMO POTENCIAL AGENTE IMUNOMODULADOR EM LINFÓCITOS HUMANOS E MURINOS ATIVADOS

VANESSA DA SILVA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa Pós Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como pré-requisito para obtenção de créditos parciais e Qualificação do trabalho de conclusão do Curso de Mestrado Acadêmico.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Santana Meira

Coorientadora: Dra. Dahara Keyse Carvalho Silva

Linha de Pesquisa: Linha 1

**Salvador
2025**

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB
Bibliotecária: Célia Maria da Costa CRB: 5/918

O48a Oliveira, Vanessa da Silva

Avaliação da 7-hidroxiflavona como potencial agente imunomodulador em linfócitos humanos e murinos ativados / Vanessa da Silva Oliveira . – Salvador, 2025.

114 f. : il.

Orientador: Cássio Santana Meira.

Coorientadora: Dahara Keyse Carvalho Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação Stricto Senso em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, Campus I. 2025.

Contém referências, apêndices e anexos.

1. Flavonoides. 2. Imunomodulação. 3. Linfócitos - Imunologia. 4. Inflamação. 5. Imunidade celular. I. Meira, Cássio Santana. II. Silva, Dahara Keyse Carvalho. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.

CDD: 616079

FOLHA DE APROVAÇÃO
"AVALIAÇÃO DA 7-HIDROXIFLAVONA COMO POTENCIAL AGENTE
IMUNOMODULADOR EM LINFÓCITOS HUMANOS E MURINOS ATIVADOS"

VANESSA DA SILVA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 25 de novembro de 2025, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

Professor Dr. Cássio Santana Meira
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI/CIMATEC
Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Professora Dr.^a Dahara Keyse Carvalho Silva
Centro Universitário Maurício de Nassau - UNINASSAU
Doutorado em Patologia Humana e Experimental
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Professora Dr.^a Erika Maria De Oliveira Ribeiro
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Professora Dr.^a Theolis Costa Barbosa Bessa
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Doutorado em Patologia Humana
Universidade Federal da Bahia - UFBA

VANESSA DA SILVA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA 7-HIDROXIFLAVONA COMO AGENTE
IMUNOMODULADOR EM LINFÓCITOS HUMANOS E MURINOS
ATIVADOS**

Linha de Pesquisa: Linha 1

Data da defesa: 25/11/2025

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Cássio Santana Meira – PPGFARMA/UNEB
Orientador

Profa. Dra. Dahara Keyse Carvalho Silva – SENAI CIMATEC
Coorientadora

Profa. Dra. Erika Maria de Oliveira Ribeiro – PPGFARMA/UNEB
Avaliadora Interna

Prof. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa – PGBSMI/FIOCRUZ
Avaliadora Externa

**Salvador
2025**

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que, com amor e esforço, sempre fizeram o que estava ao seu alcance para me verem seguir adiante e realizar os meus sonhos.

“A coisa não está nem na partida nem na chegada.

Está é na travessia...”

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Finalmente, concluo uma das etapas mais desafiadoras da minha trajetória profissional. Quando idealizava cursar o mestrado, não imaginava o quanto seria exigente. Sempre tive tudo planejado, onde prestaria seleção, quem seria meu orientador e qual programa escolheria. No entanto, em agosto de 2023, minha vida deu um giro inesperado e acabei vindo morar na última cidade que havia cogitado. Hoje, porém, só posso agradecer a Deus por ter me conduzido até aqui.

Agradeço primeiramente a Deus, pois, como já disse, foi Ele quem me trouxe até Salvador, mais precisamente à UNEB, onde encontrei realização e propósito, mesmo que, no início, nada parecesse fazer sentido. Obrigada, meu Deus, por me amparar em todos os momentos, especialmente quando duvidei de mim mesma.

Aos meus pais, minha eterna gratidão. Tudo o que faço é por vocês e para vocês. Meu maior sonho é poder retribuir, com uma vida melhor, todo o amor, esforço e apoio que sempre me dedicaram. Desde que deixei nossa casa, em 2016, vocês embarcaram comigo em cada sonho, do cursinho em Feira de Santana, à graduação em Farmácia em Petrolina e, por fim, ao desafiador mestrado em Salvador. É clichê dizer, mas Deus não poderia ter me dado pais melhores.

Outro clichê que não posso deixar de mencionar é que Deus realmente coloca anjos em nossas vidas, e um deles é o professor Cássio. Quando o escolhi como orientador, não imaginava que ganharia, além de uma orientação excepcional, um verdadeiro amigo. Cássio é um exemplo de generosidade e inspiração. Com seu jeito simples e acolhedor, ele me guiou e me fez acreditar no meu potencial como ninguém havia feito antes. Se eu me tornar um terço da pessoa e do profissional que ele é, já me considerarei realizada. Obrigada por tudo, Dr. Cássio, sua presença mudou minha vida.

Com o professor Cássio, ganhei também uma nova família: o grupo Cássio's Students. Nunca imaginei que encontraria um ambiente de trabalho tão acolhedor e repleto de amizade. Agradeço de coração a todos — Leice, Kamila, Manu, Sérgio, John, Bela, Lara, Letícia, Maciel, Gabriel, Laura, Yuri, Mavi e Jaque — por todo o apoio, parceria e carinho. Contem sempre comigo.

Outra pessoa especial que tive o privilégio de conhecer foi Dahara, a quem considero um verdadeiro presente. Sempre foi uma inspiração, e tê-la como professora e coorientadora me tornou mais forte e confiante. Obrigada por tudo, Dah. Aprendo com você todos os dias e sei que ainda tenho muito mais a aprender.

Estendo meus agradecimentos à UNEB e, em especial, aos professores Aníbal e Elisalva. Aníbal, ainda como coordenador, me orientou desde o início do processo seletivo; e a professora Elisalva, com cada aula e palavra, contribuiu profundamente para o meu amadurecimento como pesquisadora.

Aos meus companheiros de apartamento deixo um agradecimento afetuoso. Conviver com vocês tornou essa jornada muito mais leve. Cada conversa, risada e conselho foram essenciais para que eu mantivesse o equilíbrio. Amo vocês!

Agradeço também ao professor Osvaldo e a todo o seu grupo de pesquisa pelo apoio fundamental à realização deste trabalho.

Por fim, meu sincero agradecimento ao SENAI-CIMATEC, ITS e à FIOCRUZBA, instituições que tornaram possível o desenvolvimento desta pesquisa.

A felicidade não está apenas no fim da jornada, mas em cada passo do caminho. Levo comigo não só o conhecimento adquirido, mas todas as lições, experiências e pessoas que tornaram essa caminhada inesquecível.

RESUMO

Oliveira, V.S. **AVALIAÇÃO DA 7-HIDROXIFLAVONA COMO POTENCIAL AGENTE IMUNOMODULADOR EM LINFÓCITOS HUMANOS E MURINOS ATIVADOS** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2025. 126 pgs.

Distúrbios imunológicos estão associados a doenças inflamatórias e autoimunes, cujos tratamentos atuais apresentam efeitos adversos significativos, evidenciando a necessidade de novas alternativas terapêuticas. Assim, este trabalho avaliou a 7-hidroxi-flavona (7HF) como potencial agente imunomodulador em linfócitos murinos e humanos. Por meio de análises *in silico*, utilizando o ADMETLab e ProTox 3.0, a 7HF não apresentou predição de mutagenicidade, CYP2E1 e CYP2D6. Para as avaliações experimentais, esplenócitos murinos e células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram isolados e empregados em ensaios *in vitro*. A citotoxicidade da 7HF foi avaliada em células não ativadas por ensaio com iodeto de propídio, analisado por citometria de fluxo, não sendo observada citotoxicidade significativa até 40 μM . Para análise da atividade imunomoduladora, esplenócitos e PBMC ativados foram tratados com 7HF (10, 20 e 40 μM). A proliferação linfocitária foi determinada pelo ensaio CellTiter-Glo, observando-se inibição de 10%, 24% e 58% nos esplenócitos e de 16%, 34% e 78% nas PBMC, respectivamente, enquanto a dexametasona promoveu 81% e 59% de inibição. A produção de IL-2 e IFN- γ foi quantificada por ELISA, sendo reduzida pela 7HF em 15–84% e 39–61%, respectivamente, em comparação com a dexametasona (IL-2: 62%; IFN- γ : 37%). A expressão gênica foi avaliada por qRT-PCR, demonstrando supressão de genes pró-inflamatórios (IL-6, PTGS2/COX-2 e CASP-1) e modulação das vias NFAT, AP-1, JAK/STAT e do receptor de glicocorticoides, com reversão parcial dos efeitos pelo antagonista RU486. Estudos de docking molecular, realizados no software GOLD, indicaram afinidade significativa da 7HF com a calcineurina (ChemPLP = 57,05) e com o receptor glicocorticoide (ChemPLP = 49,54). Em conjunto, os resultados demonstram que a 7HF apresenta atividade imunomoduladora significativa, ausência de citotoxicidade e capacidade de modular alvos moleculares-chave da ativação linfocitária, configurando-se como uma candidata promissora para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em doenças inflamatórias e autoimunes.

Palavras-chave: 7-hidroxi-flavona; imunomodulação; linfócitos; inflamação.

ABSTRACT

OLIVEIRA, V. S. **EVALUATION OF 7-HYDROXYFLAVONE AS A POTENTIAL IMMUNOMODULATORY AGENT IN ACTIVATED HUMAN AND MURINE LYMPHOCYTES**. 2025. MASTER'S DISSERTATION — DEPARTMENT OF LIFE SCIENCES (DCV), STATE UNIVERSITY OF BAHIA, SALVADOR, 126 pgs.

Immunological disorders are associated with inflammatory and autoimmune diseases, whose current treatments present significant adverse effects, highlighting the need for new therapeutic alternatives. Accordingly, this study evaluated 7-hydroxyflavone (7HF) as a potential immunomodulatory agent in murine and human lymphocytes. Through *in silico* analyses using the ADMETLab and ProTox 3.0 platforms, 7HF showed no predicted mutagenicity and demonstrated potential inhibition of CYP2E1 and CYP2D6. For the experimental evaluations, murine splenocytes and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and employed in *in vitro* assays. The cytotoxicity of 7HF was assessed in non-activated cells using a propidium iodide assay analyzed by flow cytometry, and no significant cytotoxicity was observed up to 40 μ M. To analyze immunomodulatory activity, activated splenocytes and PBMC were treated with 7HF (10, 20, and 40 μ M). Lymphocyte proliferation was determined by the CellTiter-Glo assay, revealing inhibition of 10%, 24%, and 58% in splenocytes and 16%, 34%, and 78% in PBMC, respectively, whereas dexamethasone promoted 81% and 59% inhibition. The production of IL-2 and IFN- γ was quantified by ELISA and was reduced by 7HF by 15–84% and 39–61%, respectively, compared with dexamethasone (IL-2: 62%; IFN- γ : 37%). Gene expression was evaluated by qRT-PCR, demonstrating suppression of pro-inflammatory genes (IL-6, PTGS2/COX-2, and CASP-1) and modulation of the NFAT, AP-1, JAK/STAT, and glucocorticoid receptor pathways, with partial reversal of effects by the antagonist RU486. Molecular docking studies, performed using the GOLD software, indicated significant affinity of 7HF for calcineurin (ChemPLP = 57.05) and the glucocorticoid receptor (ChemPLP = 49.54). Taken together, these results demonstrate that 7HF exhibits significant immunomodulatory activity, absence of cytotoxicity, and the ability to modulate key molecular targets of lymphocyte activation, supporting its potential as a promising candidate for the development of new therapeutic strategies for inflammatory and autoimmune diseases.

Keywords: 7-hydroxyflavone; immunomodulation; lymphocytes; inflammation.

Lista de Abreviaturas

7HF – 7-Hidroxi flavona

Å – Angstrom

AA – Ácido araquidônico

AAA – domínio AAA

AChE – acetilcolinesterase

ADMET – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade

AhR – Aryl hydrocarbon receptor (*Receptor de hidrocarboneto arila*)

AIEs – Anti-inflamatório esteroidais

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais

AKT – Protein Kinase B (*Proteína quinase B*)

AMES – Teste Ames

AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (*receptor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico*)

AP-1 – Activator protein-1 (*proteína ativadora 1*)

AR – Androgen receptor (*receptor de andrógeno*)

ARG – Arginina

AR-LBD – Androgen receptor ligand binding domain (*domínio de ligação do ligante do receptor de andrógeno*)

ATF – Activating transcription factor (*fator de ativação de transcrição*)

ATF2 - Activating transcription factor 2 (*fator de ativação de transcrição 2*)

BAFF-R – B-cell Activating Factor Receptor (*fator de ativação do receptor de células B*)

BATF – Basic Leucine Zipper ATF-like Transcription Factor (*fator de transcrição ATFlike com zíper de leucina básico*)

BB – Blood–Brain Barrier (*barreira hematoencefálica*)

BHE – Barreira hematoencefálica

C- - controle negativo;

Ca⁺² – Íon cálcio

Caco2 – células de adenocarcinoma colorretal humano

CaM – Calmodulina

CaMK – Calcium/Calmodulin-dependent kinase (*Proteína Quinase Dependente de Cálcio/Calmodulina*)

CASP-1 – Caspase 1

CD4 – Cluster of differentiation 4 (*cluster de diferenciação 4*)

CD8 – Cluster of differentiation 8 (*cluster de diferenciação 8*)

CD28 – Cluster of differentiation 28 (*cluster de diferenciação 28*)

CD40 – Cluster of differentiation 40 (*cluster de diferenciação 40*)

cDNA – Complementary DNA (*DNA complementar*)

c-Fos – Células Fos

CFSE - Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (*éster succinimidil de carboxifluoresceína*)

c-Jun – Cellular Jun (*jun celular*)

Plasma CL – Plasma clearance (*depuração plasmática*)

c-Maf – proto-oncogene c-Maf

CO₂ – Gás carbônico

Con A – Concanavalina A

COX – Ciclooxigenase

COX-1 – Cyclooxygenase-1 (*ciclooxigenase 1*)

COX-2 – Cyclooxygenase 2 (*ciclooxigenase 2*)

COXIBs – Cyclooxygenase 2 inhibitors (*inibidores da ciclooxigenase 2*)

CRAC – Calcium Release-Activated Calcium channel (*canais de íons de cálcio ativados por liberação de cálcio*)

CYP1A2 - Cytochrome P450 1A2 (*citocromo P450 1A2*)

CYP2C19 – Cytochrome P450 2C19 (*citocromo P450 2C19*)

CYP2C9 - Cytochrome P450 2C9 (*citocromo P450 2C9*)

CYP2D6 - Cytochrome P450 2D6 (*citocromo P450 2D6*)

CYP2E1- Cytochrome P450 2E1 (*citocromo P450 2E1*)

CYP3A4 - Cytochrome P450 3A4 (*citocromo P450 3A4*)

CYPs – Cytochrome P450

CYS – Cisteína

Da – Dalton

DAMPs – Damage-associated molecular patterns (padrões moleculares associados a Danos)

Dexa – Dexametasona

DILI – Drug-Induced Liver Injury (lesão hepática induzida por medicamentos)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (meio de cultura eagle modificado de dulbecco)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DUSP1 - Dual Specificity Phosphatase 1 (*fosfatase 1 de dupla especificidade*)

E2 – Estradiol

EGCG – Epigallocatequinaolato

ELISA – Dual Specificity Phosphatase 1 (*ensaio imunoenzimático*)

ER – Endoplasmic Reticulum (*retículo endoplasmático*)

ERK – Extracellular signal-Regulated Kinase (*quinase regulada por sinal extracelular*)

ER-LBD - Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (*domínio de Ligação ao Ligante do Receptor de Estrogênio*)

FAP – Fibroblast Activation Protein (*Proteína de Ativação de Fibroblastos*)

FBKP5 – FK506 Binding Protein 5 (*proteína 5 de ligação a FK506*)

Fos – Fos proto-oncogene

FosB – Isoforma da família Fos

Fra1 – FOS-like antigen 1 (*antígeno ligante de Fos 1*)

Fra2 – FOS-like antigen 1 (*antígeno ligante de Fos 2*)

GABAR – GABA Receptor (Gamma-Aminobutyric Acid Receptor) (*Receptor de Ácido Gama-Aminobutírico*)

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*)

GLN – Glutamina

GM-CSF – Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (*fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos*)

GR – Glucocorticoid Receptor (*receptor de glicocorticoide*)

Hepato – Hepatotoxicidade

HIA – Human intestinal absorption (*absorção intestinal humana*)

Hsp40 – Heat Shock Protein 40 (*proteína de choque térmico 40*)

Hsp56 – Heat Shock Protein 56 (*proteína de choque térmico 50*)

Hsp70 – Heat Shock Protein 70 (*proteína de choque térmico 70*)

Hsp90 – Heat Shock Protein 90 (*proteína de choque térmico 90*)

IARC - International agency for research on Cancer (*agência Internacional de pesquisa sobre o câncer*)

IC50 – Concentração inibitória 50%

ID – Identificador

IFN- γ – Interferon Gama

IhERG – Inhibition of the Human Ether-à-go-go-Related Gene potassium channel (*Inibidor do canal de potássio relacionado ao gene Ether-à-go-go*)

IKB α - Inhibitor of kappa B alpha (*inibidor de NF- κ B alfa*)

IKB β - Inhibitor of kappa beta (*inibidor de NF- κ B beta*)

IKK - I κ B Inhibitor Kinase (*quinase do inibidor de kappa B*)

IL-6 – Interleukin-6 (*interleucina 6*)

IL-7 – Interleukin-7 (*interleucina 7*)

IL-10 – Interleukin-10 (*interleucina 10*)

IL-12 – Interleukin-12 (*interleucina 12*)

IL-17 – Interleukin-17 (*interleucina 17*)

IL-18 – Interleukin-18 (*interleucina 18*)

IL-1 β – Interleukin-1 beta (*interleucina 1 beta*)

IL-2 – Interleukin-2 (*interleucina 2*)

IL-23 – Interleukin-23 (*interleucina 23*)

IMIDs – Immune-mediated inflammatory diseases (*doenças inflamatórias imunomediadas*)

IP₃R – Inositol trisphosphate receptor (*receptor do inositol trifosfato*)

IRAI1 – Interleukin-1 receptor-associated inhibitor 1 (*inibidor associado a receptor de Interleucina 1*)

IRAI2 – Interleukin-1 receptor-associated inhibitor 2 (*inibidor associado a receptor de Interleucina 2*)

IRAKs – Interleukin-1 receptor-associated kinases (*receptor associado a interleucina 1*)

IRFs – Interferon regulatory factor (*fator regulador de interferon*)

JAK – Janus Kinase

JAK2 – Janus Kinase 2

JAK3 – Janus Kinase 3

JDP1 – Jun dimerization protein 1 (*proteína de dimerização Jun 1*)

JDP2 – Jun dimerization protein 2 (*proteína de dimerização Jun 2*)

JNK – c-Jun N-terminal kinase (*quinase N-terminal c-Jun*)

Jun – Jun proto-oncogene

JunB – Jun B proto-oncogene

JunD – Jun D proto-oncogene

LD50 – Lethal Dose 50 (*dose letal*)

LEU – Leucina

LogP – Partition Coefficient (coeficiente de partição)

LPS – Lipopolissacarídeo

LRF1/ATF3 – Leucine-rich Factor 1 / activating transcription Factor 3 (*fator 1 rico em leucina /fator de ativação de transcrição*)

LRR- Leucine-rich repeat (*repetição rica em leucina*)

Maf – Musculoaponeurotic Fibrosarcoma (*fibrossarcoma musculoaponeurótico*)

MafA –Musculoaponeurotic Fibrosarcoma A (*fibrossarcoma musculoaponeurótico A*)

MafB – Musculoaponeurotic Fibrosarcoma B (*fibrossarcoma musculoaponeurótico B*)

MafF – Musculoaponeurotic Fibrosarcoma F (*fibrossarcoma musculoaponeurótico F*)

MafG – Musculoaponeurotic Fibrosarcoma G (*fibrossarcoma musculoaponeurótico G*)

MafK – Musculoaponeurotic Fibrosarcoma K (*fibrossarcoma musculoaponeurótico K*)

MAPK – Mitogen-activated protein kinase (*proteína quinase ativada por mitógeno*)

MDCK - Madin-Darby Canine Kidney (*linhagem celular de rim de cão*)

MET – Metionina

MMPs - Matrix metalloproteinases (*metaloproteinases da matriz*)

mTOR – mechanistic Target of Rapamycin (*alvo da rapamicina*)

Na⁺ - Sódio

Nefro – Nefrotoxicidade

NFAT – Nuclear Factor of activated T-cells (*nuclear ativador de células T*)

NFAT1 – Nuclear Factor of activated T-cells 1 (*nuclear ativador de células T 1*)

NFAT2 – Nuclear Factor of activated T-cells 2 (*nuclear ativador de células T 2*)

NFAT4 – Nuclear Factor of activated T-cells 4 (*nuclear ativador de células T 4*)

NF-κB – Nuclear Factor kappa B (*fator nuclear do NF-κB*)

NF-κB2 – Nuclear Factor kappa B 2 (*fator nuclear do NF-κB 2*)

NIK – NF-κB-Inducing Kinase (*quinase indutora de NF-κB*)

NK – Natural Killer (*assassino natural*)

NLR - Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptor (*receptor semelhante ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos*)

NLRP3 – NOD-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 (*família de receptores do tipo NOD com domínio Pirina contendo 3*)

NLS – Nuclear Location Signals (*localização de sinal nuclear*)

NMDAR - receptor N-metil-D-aspartato (*receptor de N-metil-D-aspartato*)

NO – Nitric oxide (*óxido nítrico*)

NOD- Nucleotide-binding Oligomerization Domain (*domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos*)

No-RT – No reverse transcriptase control (*controle sem transcriptase reversa*)

nrf2/ARE - Nuclear Factor Erythroid 2–Related Factor 2 / Antioxidant Response Element (*Fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2/ elemento de resposta antioxidante*)

NTC – No template control (*controle sem molde*)

ORAI1 - ORAI Calcium Release-Activated Calcium Modulator 1 (*modulador 1 de cálcio ativado por liberação de cálcio*)

P23 – p23 co-chaperone (co-chaperona p23)

p50/RelA - complexo heterodimérico do fator de transcrição NF-κB

p52/RelB - complexo heterodimérico formado pelas proteínas p52 e RelB

PAMPs - Pathogen-associated molecular Patterns (*padrões Moleculares associados a patógenos*)

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PDB - Protein Data Bank (*banco de dados de proteínas*)

PG2 – Prostaglandina 2

PGD2 – Prostaglandina D2 ,

PGE2 – Prostaglandina E2

PGI2 – Prostaglandina I2

PHA – Phytohemagglutinin (fitohemaglutinina)

PHE – Fenilalanina

PI – Iodeto de Propideo

PI3KC – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit (*subunidade catalítica da fosfatidilinositol-4-5-bifosfato*)

PKC – Protein Kinase C (*proteína quinase C*)

PLC – Phospholipase C (*fosfolipase C*)

PLCG1 – Fosfolipase C gama 1 (*fosfolipase C gama 1*)

PM – Peso molecular

PP – Plasma Protein (*proteínas plasmáticas*)

PPAR-Gamma - Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma*)

PPP3C α – Protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha (Subunidade catalítica alfa isoforma da proteína)

PPP3C β – Protein phosphatase 3 catalytic subunit beta (Subunidade catalítica beta isoforma da proteína)

PPP3C γ – Protein phosphatase 3 catalytic subunit gamma (Subunidade catalítica gama isoforma da proteína)

PRO – Prolina

PRRs – Pattern Recognition Receptors (*receptor de reconhecimento de padrões*)

PTGS2 – Ciclooxygenase 2

qPCR –Quantitative polymerase Chain Reaction (*reação em cadeia da polimerase quantitativa*)

qRT-PCR – Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (*reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa em tempo real*)

RANK - Receptor activator of nuclear factor kappa B (*receptor do fator nuclear Kappa B*)

RAS – Rat sarcoma (sarcoma de rato)

RE – Retículo endoplasmático

RelA – Transcription Factor RelA (fator de transcrição do RelA)

RIP1 - Receptor-interacting protein kinase 1(*proteína quinase 1 que interage com o receptor*)

RLU – Relative light units (*Unidade de luz relativa*)

RMSD - Root mean square deviation (*desvio Quadrático Médio*)

ROS – Reactive oxygen species (*espécies reativas de oxigênio*)

RRPs - Receptores de reconhecimento de padrões

RU 486 – Mifepristona

RYR - Ryanodine receptor (*receptor de rianodina*)

SALH – Sítios aceptores

SBF – Soro bovino fetal

SDLH– Structure-activity / lipophilicity / hydrogen bond acceptors (*estrutura-atividade / lipofilicidade/ aceitadores de ligação de hidrogênio*)

SGK1 - Serum- and glucocorticoid-regulated Kinase 1 (*cinase 1 regulada por soro/glicocorticoide*)

SNC – Sistema Nervoso central

SOCE – Store-operated calcium entry (*canal de entrada de cálcio operado por estoque*)

STAT – Signal transducer and activator of transcription (transdutor de sinal e ativador da transcrição)

STAT1 – Signal transducer and activator of transcription 1 (*transdutor de sinal e ativador da transcrição 1*)

STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3 (*transdutor de sinal e ativador da transcrição 3*)

STAT6 - Signal transducer and activator of transcription 6 (*transdutor de sinal e ativador da transcrição 6*)

STIM1 – Stromal interaction molecule 1 (*molécula de interação estromal 1*)

STIM2 – Stromal interaction molecule 1 (*molécula de interação estromal 1*)

T1/2 – Tempo de meia vida

TCR – T cell receptor (*receptor de células T*)

TGF-β – Transforming Growth Factor Beta (*fator de crescimento transformador B*)

TGI – Trato gastrointestinal

Th1 - T Helper 1 cells 1 (*células T auxiliares tipo 1*)

Th2 – T Helper 1 cells2 (*células T auxiliares tipo 2*)

THR α - Thyroid Hormone Receptor Alpha (*receptor alfa de hormônios tireoidianos*)
adrenérgicos alfa

TLRs – Toll-Like receptors (*receptor Toll-Like*)

TNF – Tumor necrosis factor (*fator de necrose tumoral*)

TNF- α – Tumor necrosis factor alfa (*fator de necrose tumoral alfa*)

TPSA - Topological polar surface area (*área de superfície polar topológica*)

TRAFs - TNF receptor-associated factors (*fatores associados ao receptor ao TNF*)

Tregs – Regulatory T cells (*células T reguladoras*)

TRP – Triptofano

TSC22D3 - TSC22 Domain Family Member 3 (*membro 3 da família do domínio TSC22*)

TTR – Transthyretin (*transtirretina*)

TXA2 – Tromboxano A2

TYR – Tirosina

VG – Violeta de genciana

VM – volume molecular

π -alkyl - Interação entre anel aromático ou grupo π e um grupo alquil

π -sulfur - Interação entre um anel aromático e enxofre de aminoácido

π - π stacking - Interação entre dois anéis aromáticos (empilhamento)

Lista de Figuras

Figura 1 - Dinâmica temporal da imunidade inata e adaptativa após infecção	32
Figura 2 - Vias de sinalização intracelular ativadas pelos receptores Toll-like (TLRs)	33
Figura 3 - Vias de ativação do NFAT em células T	40
Figura 4 - Funções biológicas da via de sinalização do NF- κ B	41
Figura 5 - Via do metabolismo do ácido araquidônico	43
Figura 6 - Estrutura básica dos flavonoides e seus derivados	45
Figura 7 - Ilustração esquemática dos efeitos dos flavonoides na via de sinalização do NF- κ B	46
Figura 8 - Perfil de propriedades físico-químicas dos isômeros 7HF	58
Figura 9 - Predição da atividade de isoenzimas do citocromo P450 (CYP) para 7HF.....	67
Figura 10 - Heatmap dos possíveis efeitos da 7HF em vias da toxicidade	69
Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade da 7HF em esplenócitos de camundongos BALB/c	71
Figura 12 - Efeito da 7-hidroxi-flavona (7HF) sobre a proliferação de linfócitos estimulados com concanavalina A (Con A)	73
Figura 13 - Gráfico da redução da produção da IL-2 e IFN- γ em linfócitos tratados com a 7HF	74
Figura 14 - A 7HF não causou hemólise nas concentrações testadas.....	75

Figura 15 - Citotoxicidade da 7HF em células de PBMC humano.....	77
Figura 16 - A 7HF reduz a linfoproliferação de linfócitos ativados com PHA e possui seus efeitos parcialmente revertidos na presença do RU 486	79
Figura 17 - Redução da produção da IL-2 e IFN- γ em linfócitos tratados com a 7HF.....	81
Figura 18 – Heatmap dos genes relacionados as vias inflamatórias.	84
Figura 19. Validação do Protocolo de Docking Molecular por Redocking de Ligantes de Referência	87
Figura 20. Dexametasona Acoplada ao Sítio de Ligação da Calcineurina	88
Figura 21. Visão geral do acoplamento da dexametasona à calcineurina	88
Figura 22. 7-Hidroxi flavona Acoplada ao Sítio de Ligação da Calcineurina	89
Figura 23. 7-Hidroxi flavona Acoplada ao Sítio de Ligação da Calcineurina	89
Figura 24. Dexametasona Acoplada ao Sítio de Ligação do Receptor Glicocorticoide	90
Figura 25. Interações Detalhadas Ligante–Proteína da Dexametasona no Sítio de Ligação do Receptor Glicocorticoide	90
Figura 26. 7-Hidroxi flavona Acoplada ao Sítio de Ligação do Receptor Glicocorticoide	91
Figura 27. Representações 3D e 2D das Interações da 7-Hidroxi flavona com o Receptor Glicocorticoide	91
Figura 28. Representação esquemática integrada dos efeitos biológicos, moleculares e computacionais da 7-hidroxi flavona (7HF).....	93

Lista de Quadros

Quadro 1 - Genes avaliados por qRT-PCR e os respectivos primers utilizados
..... **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 2 - Avaliação do perfil de Biodisponibilidade oral **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 3 - Predições farmacocinéticas para a 7HF **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 4 - Predição in silico da toxicidade da 7HF **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 5 - Predições da toxicidade em órgãos e endpoints **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVO GERAL	31
3.1 Objetivos específicos.....	31
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	32
4.1 Sistema Imune	32
4.2 Inflamação	34
4.3 Vias de ativação da Inflamação	37
4.3.1 Crosstalk entre vias dependentes de cálcio na resposta inflamatória.....	37
4.4 Anti-inflamatórios não esteroidais e anti-inflamatórios esteroidais ...	42
4.5 Produtos naturais	43
4.5.1 Flavonoides.....	44
5. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1 Molécula em estudo	48
5.2 Ensaio in silico	48
5.2.1 ADMETLab	48
5.2.2 PROTOX 3.0	49

5.3 Animais	49
5.4 Ensaio de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos BALB/c	49
5.5 Ensaio de linfoproliferação em esplenócitos de camundongos BALB/c	50
5.6 Dosagem de citocinas em esplenócitos de camundongos BALB/c	50
5.7 Coleta do PBMC	51
5.8 Ensaio de hemólise	51
5.9 Citotoxicidade frente a PBMC	52
5.10 Ensaio de linfoproliferação em PBMC	52
5.11 Dosagem de citocinas em PBMC	52
5.12 Análise da expressão gênica - Via do NFAT – GR	53
5.13 Ancoramento (docking) Molecular	53
5.13.1 Estrutura dos ligantes.	53
5.13.2 Docking Molecular	54
5.13.3 Ferramentas de Visualização	54
5.14 Análise estatística	54

6. RESULTADOS	56
6.1 Avaliação da atividade <i>in silico</i> da 7-hidroxiﬂavona	54
6.1.1 ADMETLab	57
6.1.2 PROTOX 3.0	65
6.2 Avaliação da citotoxicidade da 7-hidroxiﬂavona em esplenócitos murinos	70
6.3 A 7-hidroxiﬂavona inibe a linfoproliferação em esplenócitos ativados com Concanavalina A	72
6.4 A 7-hidroxiﬂavona reduz a produção de mediadores inﬂamatórios ...	74
6.5 Avaliação do efeito da 7-Hidroxiﬂavona sobre as hemácias	75
6.6 Avaliação da citotoxicidade da 7-Hidroxiﬂavona em linfócitos humanos	76
6. 7 A 7HF inibe a linfoproliferação em linfócitos humanos ativados com ﬁtohemaglutinina (PHA)	78
6.8 A 7-hidroxiﬂavona reduz a produção de mediadores inﬂamatórios em linfócitos humanos	81
6.9 A 7-Hidroxiﬂavona modula a expressão gênica de genes envolvidos no processo inﬂamatório	83
6.10 Ancoragem (Docking Molecular)	87
7. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS E APÊNDICES	111

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico constitui uma complexa rede de células e moléculas distribuídas por todo o organismo, cuja função essencial é reconhecer estruturas moleculares específicas e desencadear respostas efetivas contra antígenos. Por meio da ativação de células efetoras, como linfócitos e macrófagos, e da produção de anticorpos, esse sistema assegura a defesa do indivíduo. No entanto, em determinadas circunstâncias, a resposta imune pode tornar-se desregulada, resultando em efeitos deletérios associados a processos inflamatórios exacerbados ou ineficazes (Cruvinel *et al.*, 2010; Chaplin, 2010).

Durante uma inflamação exacerbada, ocorre a liberação de diversas moléculas pró-inflamatórias, incluindo óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas, quimiocinas, moléculas de adesão e eicosanóides, que, quando em excesso, contribuem para o dano tecidual (Hung *et al.*, 2017; Medzhitov, 2021). Esse desequilíbrio está associado ao desenvolvimento de doenças inflamatórias e imunomediadas, nas quais alterações no metabolismo e na ativação de linfócitos e macrófagos desempenham papel central na patogênese (Perez-Sepúlveda *et al.*, 2014; Tsokos, 2020).

Os principais fármacos utilizados no manejo dessas condições incluem os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e os glicocorticóides. Apesar de sua eficácia, o uso prolongado e muitas vezes indiscriminado desses medicamentos está associado a efeitos adversos importantes, como toxicidade gastrointestinal, disfunções cardiovasculares, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, hipertensão e alterações metabólicas (Dreischulte *et al.*, 2015).

Nesse contexto, os produtos naturais surgem como fonte promissora de novos candidatos terapêuticos. Entre eles, os flavonoides destacam-se por sua diversidade estrutural e múltiplas atividades farmacológicas, incluindo efeitos antioxidantes, imunomoduladores e anti-inflamatórios (Maleki *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2023). As flavonas, subclasse dos flavonoides, têm sido associadas as atividades antinociceptivas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antiulcerogênicas e anticancerígenas (Boligon *et al.*, 2014; Domingos *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Saha *et al.*, 2020; Zaragoza *et al.*, 2020).

Dentre essas moléculas, a 7-Hidroxiavona (7HF), um derivado da subclasse das flavonas, possui uma estrutura básica de 2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona, com um grupo hidroxila na posição C-7 do anel benzopirano, conferindo-lhe propriedades químicas relevantes, como maior capacidade de doação de hidrogênio e interação com alvos biológicos específicos (Panche *et al.*, 2016). Do ponto de vista biológico, a 7HF tem demonstrado efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiproliferativos em diferentes modelos experimentais, modulando vias intracelulares como Fator Nuclear kappa B (NF-κB) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), além de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (Chen *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020;).

Apesar desses achados promissores, os estudos que investigam de forma sistemática a ação imunomoduladora da 7HF em células humanas ainda são escassos. Essa lacuna evidencia a necessidade de pesquisas que aprofundem o conhecimento sobre seus efeitos celulares e moleculares, fornecendo bases para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seguras e eficazes no manejo de doenças imunomediadas.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças imunomediadas, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase e doença de Crohn, configuram um importante desafio para a saúde pública, devido à ativação desregulada do sistema imunológico, que resulta em inflamação crônica, danos teciduais progressivos e comprometimento da qualidade de vida dos pacientes. Mais de 80 doenças autoimunes já foram descritas, afetando cerca de 5% a 10% da população mundial (Li *et al.*, 2023). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Reumatologia, conforme reportado pela Agência Brasil (2025), indica que cerca de 15 milhões de pessoas são acometidas por algum tipo de doença reumática, número que reflete a ampla prevalência de condições inflamatórias e autoimunes na população e o impacto crescente dessas enfermidades sobre o sistema de saúde.

O manejo clínico dessas condições inclui corticosteroides, imunossupressores, agentes biológicos e inibidores de JAK; entretanto, esses tratamentos estão frequentemente associados a efeitos adversos significativos, como osteoporose, hipertensão, alterações metabólicas, maior risco de infecções e predisposição ao desenvolvimento de neoplasias (Smolen *et al.*, 2020; Athanassiou & Athanassiou, 2023). Diante dessas limitações, a busca por alternativas terapêuticas seguras e eficazes torna-se prioritária. Nesse contexto, produtos naturais têm se destacado como fontes promissoras de compostos bioativos capazes de modular respostas imunológicas e processos inflamatórios com menor risco de efeitos sistêmicos adversos. Entre eles, as flavonas mostram potencial relevante, interferindo em vias de sinalização intracelular, como NF- κ B, MAPKs e AP-1, e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (González-Gallego *et al.*, 2011; Panche *et al.*, 2016; Maleki *et al.*, 2019).

A 7HF, derivada das flavonas, apresenta propriedades químicas que favorecem interações específicas com alvos celulares. Essa molécula tem demonstrado efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiproliferativos em modelos experimentais (Zhao *et al.*, 2014), sugerindo seu potencial como modulador da resposta imunológica. No entanto, ainda existem lacunas importantes quanto à sua ação em células humanas do sistema imunológico e aos mecanismos moleculares envolvidos.

Investigar a 7HF permitirá aprofundar a compreensão de seus efeitos celulares e moleculares, oferecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras, com menor perfil de toxicidade, que possam complementar ou substituir abordagens farmacológicas tradicionais. Estudos dessa natureza contribuem não apenas para o avanço do conhecimento científico sobre flavonas imunomoduladoras, mas também para a ampliação do arsenal de alternativas terapêuticas seguras para o tratamento de doenças imunomediadas.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencial atividade imunomoduladora da 7-Hidroxi-flavona em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas e de camundongos.

3.1 Objetivos específicos

- Predizer, por meio de ferramentas *in silico*, as propriedades físico-químicas da molécula em estudo;
- Investigar a citotoxicidade da 7-Hidroxi-flavona em esplenócitos de camundongos BALB/c;
- Caracterizar o efeito antiproliferativo e modulador da produção de citocinas da 7-Hidroxi-flavona em esplenócitos de camundongos BALB/c;
- Verificar o efeito hemolítico da 7-Hidroxi-flavona em PBMC humanas;
- Analisar a citotoxicidade da 7-Hidroxi-flavona em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC);
- Avaliar o efeito antiproliferativo e modulador da produção de citocinas da 7-Hidroxi-flavona em PBMC humana ativadas;
- Elucidar o efeito da 7-Hidroxi-flavona sobre a expressão de mediadores inflamatórios;
- Investigar, por meio de ancoragem molecular (docking molecular), a interação da 7-Hidroxi-flavona com a fosfatase calcineurina e com o receptor de glicocorticoide.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Sistema Imune

O sistema imunológico atua como um mecanismo dinâmico e integrado de defesa, responsável por reconhecer e eliminar microrganismos patogênicos, células tumorais e estruturas alteradas do próprio organismo, além de contribuir para a manutenção da homeostase (Silverthorn, 2016; Abbas *et al.*, 2019). Ele é formado por uma ampla rede de células, moléculas solúveis e órgãos especializados, como linfócitos T, macrófagos, células dendríticas, que atuam de forma coordenada para desencadear respostas protetoras frente a diferentes ameaças (**Figura 1**).

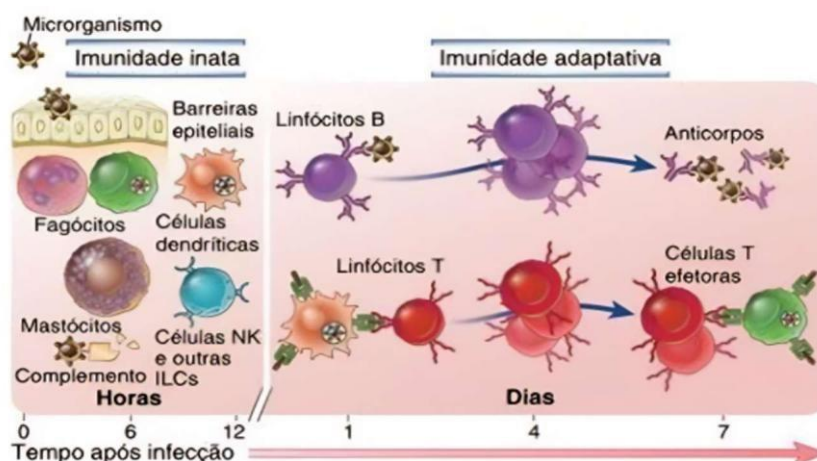


Figura 1. Resposta imune inata e adaptativa ao longo do tempo após a infecção. A imunidade inata é a primeira linha de defesa, atuando nas primeiras horas após o contato com o microrganismo por meio de barreiras epiteliais, fagócitos, mastócitos, células dendríticas, células NK e proteínas do sistema complemento. Essa resposta inicial limita a propagação do agente infeccioso e ativa a imunidade adaptativa. Após alguns dias, linfócitos T e B são ativados: os linfócitos T diferenciam-se em células T efetoras, responsáveis pela eliminação de células infectadas, enquanto linfócitos B originam plasmócitos produtores de anticorpos, que neutralizam patógenos e promovem memória imunológica.

Fonte: Abbas *et al.*, 2019.

De maneira geral, a resposta imune é dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa, sendo rápida, porém menos específica quando comparada a imunidade adaptativa, e mediada por barreiras físicas, moléculas solúveis e células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células NK. Essas células reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs)

por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores Toll-like (TLRs) (**Figura 2**). A ativação dessas vias desencadeia cascatas de sinalização intracelular que induzem a expressão de genes associados à resposta inflamatória, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (El-Zayat *et al.*, 2019; Duan *et al.*, 2022).

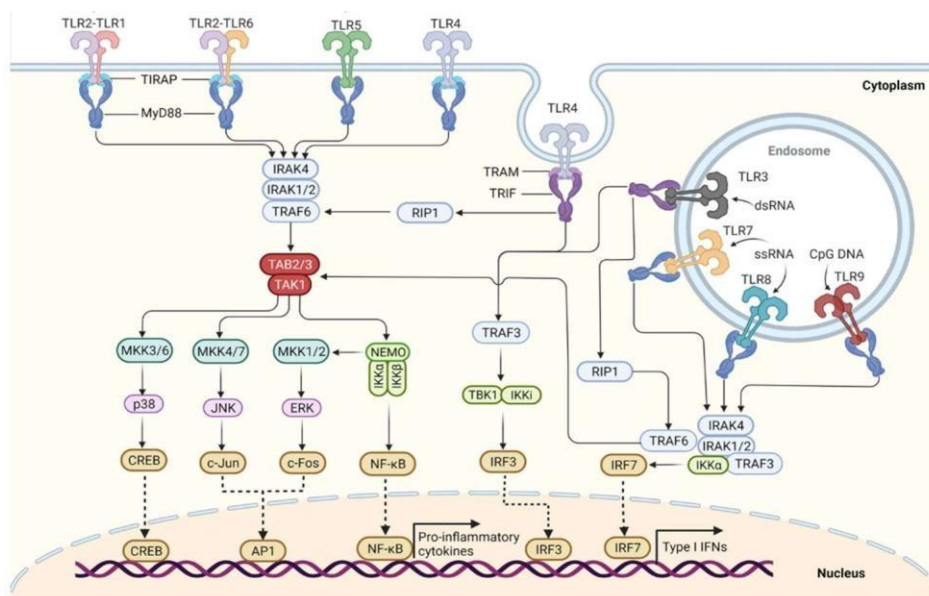


Figura 2. Vias de sinalização ativadas pelos receptores Toll-like (TLRs). Os TLRs reconhecem diferentes padrões moleculares associados a microrganismos e, após ativação, recrutam adaptadores intracelulares como MyD88 e TRIF. Essas interações desencadeiam cascatas de sinalização envolvendo proteínas como IRAKs, TRAFs e RIP1, que convergem para a ativação de fatores de transcrição, incluindo NF-κB, AP-1 e IRFs. O resultado final é a indução de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I, fundamentais para a resposta imune inata e para a ativação da imunidade adaptativa.

Fonte: Duan *et al.*, 2022.

Já a imunidade adaptativa é caracterizada por maior especificidade e capacidade de memória. É mediada principalmente pelos linfócitos B e T, que reconhecem antígenos por meio de receptores específicos. Os linfócitos B participam da imunidade humoral, produzindo anticorpos capazes de neutralizar patógenos e facilitar sua eliminação. Os linfócitos T exercem papel central na imunidade celular, incluindo a ativação de macrófagos, a destruição de células infectadas ou tumorais (linfócitos T CD8⁺) e a regulação negativa da inflamação (linfócitos T reguladores) (Bonilla & Oettgen, 2010).

A comunicação entre os diferentes compartimentos do sistema imune é mediada por citocinas, pequenas proteínas que atuam como mensageiros intracelulares. Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, participam da ativação inicial da defesa, enquanto citocinas reguladoras, como IL-10 e TGF- β , limitam a inflamação e favorecem o retorno à homeostase (Medzhitov, 2007). O equilíbrio entre esses mediadores é determinante para que a resposta seja eficaz contra o agente agressor, mas sem causar dano exacerbado ao hospedeiro.

Em nível molecular, a ativação de células imunes está estreitamente associada à ativação de fatores de transcrição como NFAT, NF- κ B e AP-1, que modulam a expressão de genes relacionados à proliferação, diferenciação e produção de citocinas. Esses fatores funcionam como pontos de integração entre os sinais provenientes de receptores de reconhecimento de padrão, receptores de citocinas e receptores de antígeno, constituindo alvos centrais na coordenação da resposta imunológica (Karin & Lin, 2002, Macian, 2005; Müller & Rao, 2010; Hayden & Ghosh, 2012).

4.2 Inflamação

A inflamação é um mecanismo de defesa essencial dos organismos, caracterizado pelo reconhecimento de estímulos nocivos e pela ativação de uma resposta coordenada para neutralizá-los. Diversos fatores podem desencadear o processo inflamatório, incluindo a formação de coágulos sanguíneos, como em acidentes vasculares cerebrais isquêmicos; disfunções do sistema imunológico; desenvolvimento de câncer; condições neurológicas, como a doença de Alzheimer; e infecções causadas por patógenos virais, bacterianos, fúngicos ou protozoários (Bogliolo & Brasileiro Filho, 2016).

Enquanto a resposta inflamatória é crucial para a proteção e recuperação do organismo, sua desregulação pode contribuir para a patogênese de várias doenças. Uma vez iniciado, o processo inflamatório envolve a liberação de substâncias químicas mediadoras e proteínas sinalizadoras, que têm como objetivo inativar, bloquear ou eliminar o agente causador. Esse processo é marcado por alterações vasculares, aumento da permeabilidade, recrutamento e ativação de leucócitos, além da produção de fluidos e remoção de células danificadas. Esses eventos visam promover o reparo celular e a renovação tecidual, restaurando a funcionalidade do

tecido afetado. Os sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, dor, edema e perda de função, refletem as alterações locais e sistêmicas geradas por essa complexa resposta imunológica. Quando bem regulada, a inflamação é indispensável para a recuperação e manutenção da saúde. Entretanto, sua desregulação pode resultar em danos teciduais e contribuir para o desenvolvimento de condições patológicas (Etienne *et al.*, 2021).

Logo após o estímulo inicial, sinais como rubor (vermelhidão) e calor são observados como consequências da dilatação vascular e do aumento da permeabilidade capilar, que resultam em um maior fluxo sanguíneo para o local afetado. Esse aumento no fluxo, combinado com o recrutamento de leucócitos e a infiltração de fagócitos, contribui para a formação do edema. A dor surge devido à compressão das terminações nervosas pelo edema e à liberação de substâncias químicas inflamatórias em resposta à lesão. A interação entre dor e edema pode levar à perda de função, especialmente em articulações, tecidos ou membros, limitando movimentos e impactando a rotina dos pacientes. A inflamação é classificada em aguda e crônica, dependendo de sua duração e intensidade. A inflamação crônica ocorre quando o sistema imunológico é incapaz de eliminar a causa da inflamação aguda, frequentemente associada a distúrbios autoimunes ou danos às células imunológicas, entre outros fatores (Bogliolo & Brasileiro Filho, 2016).

No contexto da inflamação aguda, a classificação baseia-se no tipo de exsudato produzido, bem como na duração e na intensidade da agressão. Esse processo envolve mediadores químicos que coordenam a resposta inflamatória, incluindo aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária (FAP), quimiocinas, fator de necrose tumoral (TNF) e citocinas, como IL-1 β , IL-6 e IL-18. Esses mediadores desempenham um papel central na neutralização, inativação e eliminação do agente agressor, além de iniciar o processo de reparo tecidual. Durante ou após a resolução da inflamação, o tecido danificado pode ser substituído por fibrose, como parte do reparo estrutural, contribuindo para a restauração parcial ou total da integridade tecidual (Singh *et al.*, 2016).

Na inflamação crônica, diferentemente da inflamação aguda, ocorre a ativação simultânea de processos inflamatórios e de destruição tecidual. Essa condição se

desenvolve quando os mecanismos de defesa do organismo são incapazes de eliminar o patógeno ou o agente causador da inflamação. A progressão desse quadro depende de diversos fatores, como a duração da injúria, a persistência do agente agressor, a repetição de episódios de inflamação aguda e a incapacidade do organismo em resolver o processo inflamatório. Como resultado, há uma produção contínua de exsudato inflamatório e o recrutamento de linfócitos e outras células imunes, o que perpetua o estado inflamatório crônico (Bogliolo & Brasileiro Filho, 2016).

A ativação contínua de processos inflamatórios pode levar ao desenvolvimento de reações autoimunes, nas quais o sistema imunológico ataca os próprios tecidos, resultando em doenças mediadas pelo sistema imunológico (*immune-mediated inflammatory diseases* – IMIDs) (Feghali e Wright, 1997). O termo IMIDs refere-se a um grupo de doenças inflamatórias com etiologia multifatorial, que podem afetar diferentes órgãos e sistemas do corpo. Essas condições representam um problema significativo de saúde pública, pois compartilham vias inflamatórias comuns, resultando na desregulação das funções do sistema imunológico, tanto inato quanto adaptativo (Monteleone *et al.*, 2023).

Embora a etiologia das IMIDs seja complexa e frequentemente indefinida, fatores como suscetibilidade genética, infecções e traumas ambientais desempenham um papel importante em sua indução. Entre as principais, estão psoríase, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e lúpus eritematoso sistêmico, condições que, embora tenham características específicas, compartilham uma resposta inflamatória desregulada (Bunte & Beikler, 2019).

O sistema imunológico possui a capacidade notável de distinguir entre antígenos próprios e externos, um fenômeno conhecido como autotolerância. Essa propriedade é essencial para evitar reações contra proteínas do próprio organismo, promovendo a homeostase. Quando a autotolerância falha, o organismo começa a produzir anticorpos contra seus próprios componentes, processo frequentemente mediado pela interação entre linfócitos B e células T (Silverthorn, 2019). Nesse cenário, ocorre o recrutamento de células pró-inflamatórias, como macrófagos, linfócitos e plasmócitos, que promovem uma produção exacerbada de fatores de crescimento, enzimas e citocinas. Esses mediadores amplificam a resposta

inflamatória, perpetuando o processo inflamatório e causando lesão tecidual (Cutolo *et al.*, 2019).

Essa cascata de eventos contribui para o desenvolvimento e a progressão de doenças autoimunes, nas quais o sistema imunológico não apenas falha em reconhecer antígenos próprios, mas também ataca tecidos saudáveis, resultando em inflamação crônica e danos teciduais. O entendimento detalhado desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de terapias direcionadas, com o objetivo de restaurar a autotolerância e controlar a inflamação em condições autoimunes (Milenkovic *et al.*, 2019).

4.3 Vias de ativação da Inflamação

A ativação do sistema imune envolve uma complexa rede de vias de sinalização intracelular que atuam de forma integrada, e não de maneira independente. Entre as mais importantes destacam-se os eixos Ca^{2+} /calcineurina/NFAT, NF- κ B e AP-1, além das cascatas de quinases JAK/STAT, MAPK, ERK e JNK. Essas rotas compõem um intrincado *crosstalk*, cujas interações garantem tanto a amplificação quanto a regulação fina da resposta inflamatória (Kipanyula *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2022).

4.3.1 Crosstalk entre vias dependentes de cálcio na resposta inflamatória

O Ca^{2+} é amplamente reconhecido como um dos mensageiros secundários mais universais e versáteis da biologia celular, atuando em praticamente todos os tipos celulares e em uma grande variedade de processos fisiológicos. No sistema imunológico, sua importância é ainda mais evidente, pois regula desde respostas rápidas, como a ativação de fatores de transcrição, até eventos de longo prazo, como a proliferação e diferenciação linfocitária (Berridge *et al.*, 2000; Feske, 2007).

O influxo de Ca^{2+} para o citoplasma ocorre inicialmente a partir do retículo endoplasmático (RE), por abertura dos canais de receptores de inositol trifosfato (IP_3R). A depleção dessas reservas ativa a entrada de cálcio dependente de estoques (SOCE, *store-operated calcium entry*), em que as proteínas STIM1/2, sensores de Ca^{2+} no RE, interagem com os canais Orai1 da membrana plasmática (Prakriya & Lewis, 2015).

O Ca^{2+} destaca-se como integrador por modular diversas vias de sinalização intracelular. Ele coordena a ativação de fatores de transcrição como NFAT, AP-1 e NF κ B, estabelecendo uma rede de *crosstalk* entre essas rotas (Hong *et al.*, 2003). Sinais transitórios ou oscilatórios de cálcio, em contraste com sinais sustentados, induzem perfis transcricionais distintos. Assim, além de atuar como segundo mensageiro, o Ca^{2+} funciona como codificador da resposta imune, determinando se uma célula T entrará em ativação, diferenciação ou tolerância (Feske, 2019).

A via do NFAT é o exemplo mais paradigmático dessa dependência do Ca^{2+} (**Figura 3**). Os membros da família NFAT1-NFAT4 permanecem no citoplasma em estado inativo, fosforilados. O aumento sustentado de Ca^{2+} citosólico leva à ligação desse íon à calmodulina, que, ao ser ativada, estimula a calcineurina, uma fosfatase dependente de Ca^{2+} . A calcineurina desfosforila resíduos regulatórios em NFAT, expondo sinais de localização nuclear (NLS) e permitindo a translocação para o núcleo (Hogan *et al.*, 2003; Macian, 2005; Feske, 2007).

Entretanto, uma vez no núcleo, o NFAT, isoladamente, apresenta atividade transcricional limitada e relativamente fraca, sua efetividade exige a cooperação com fatores da família AP-1, formados por heterodímeros de Fos e Jun (Rao *et al.*, 1997). Essa cooperação é de suma importância, visto que esses fatores reconhecem elementos adjacentes promotores de genes-chaves, como a IL-2, permitindo a indução da resposta imune adaptativa (Macián *et al.*, 2001).

O AP-1 é um grupo de fatores de transcrição que inclui quatro subfamílias: Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K, Nrl) e ATF (ATF2, LRF1/ATF3, BATF, JDP1, JDP2). Ele exerce papéis centrais na ativação de células T, diferenciação de células Th, anergia e exaustão (Atsaves *et al.*, 2019). Sua atividade é regulada principalmente pelas cascatas de quinases MAPK: ERK, JNK e p38 (Whitmarsh & Davis, 1996). Durante a ativação de células T, a sinalização do TCR/CD28 via PI3K e PLC converge para a JNK, aumentando a atividade do AP-1, que se associa ao NFAT para transativar genes cruciais, como o da IL-2. A ausência de AP-1 resulta em baixa eficiência transcricional do NFAT e favorece anergia ou exaustão celular (Liu *et al.*, 2004).

Essa integração permite que o AP-1 atue como plataforma versátil, respondendo a sinais mitogênicos, inflamatórios ou de estresse celular. A cooperação com o NFAT é sensível à intensidade do sinal de Ca^{2+} : ele deve ser sustentado para manter o NFAT no núcleo em alta atividade, enquanto a ativação das MAPKs garante a disponibilidade de Fos/Jun para a dimerização. Assim, o eixo Ca^{2+} /calcineurina–NFAT conecta-se intrinsecamente ao eixo Ras/MAPK–AP-1, formando um “módulo transcricional” que governa a expressão de genes essenciais da resposta imune, como IL-2, IFN- γ e TNF- α (Macian, 2005; Hogan *et al.*, 2010).

Entre os fatores de transcrição centrais da imunidade, o NF- κ B ocupa posição de destaque por integrar sinais pró-inflamatórios de diversas origens. Essa via é ativada por receptores de antígeno, citocinas e TLRs, além de estímulos de estresse celular (Hayden & Ghosh, 2008). Em condições basais, os dímeros de NF- κ B permanecem inativos no citoplasma ligados a inibidores da família I κ B. A ativação do complexo quinase I κ B (IKK) leva à fosforilação e degradação de I κ B, liberando o NF- κ B para translocar ao núcleo e induzir genes inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e moléculas coestimuladoras (**Figura 4**) (Hayden & Ghosh, 2012).

Além da via clássica, que envolve degradação rápida de I κ B α , existe a via alternativa dependente da quinase NIK e da conversão de p100 em p52 (NF- κ B2), regulando o desenvolvimento linfóide e a manutenção da resposta imune adaptativa (Sun *et al.*, 2017). Embora a ativação do NF- κ B dependa sobretudo de receptores associados a padrões moleculares, aumentos sustentados de Ca^{2+} intracelular também podem ativar calcineurina e quinases como PKC, contribuindo para a ativação do complexo IKK e a translocação nuclear do NF- κ B (Gorobets *et al.*, 2024).

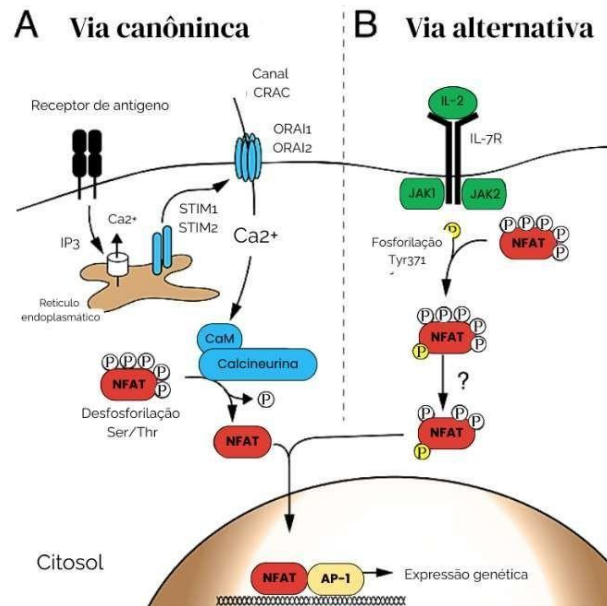


Figura 3. Via canônica e não-canônica de ativação de células T. (A) A estimulação do receptor de antígeno leva a produção de IP3, que abre os canais de IP3R no RE. A subsequente diminuição da concentração de Ca⁺² no RE ativa as moléculas de STIM1/2 que abrem os canais ativados por liberação de Ca⁺² (CRAC) formados pelas proteínas ORA11/2 na membrana plasmática. O influxo pelo CRAC ativa a calmodulina (CaM) e a fosfatase serina/treonina calcineurina. Essa fosfatase desfosforila múltiplos resíduos no domínio regulador do NFAT, resultando na mudança conformacional, exposição de sinais de localização nuclear e translocação para o núcleo. (B) A Janus quinase 3 (JAK3), a jusante do receptor de IL-7, fosforila um único resíduo de tirosina no domínio regulador do NFAT2, induzindo a translocação nuclear e ativação do NFAT2 de forma independente dos sinais de Ca⁺² e da calcineurina.

Fonte: Adaptado de Vaeth *et al.*, 2018.

Outra via essencial no processo inflamatório é a JAK/STAT. Diferentemente de NFAT e NF- κ B, que respondem diretamente a receptores de antígeno ou coestímulos, essa rota funciona como amplificador secundário, transmitindo os efeitos autócrinos e parácrinos das citocinas liberadas na ativação inicial (Xue *et al.*, 2023). As JAKs, tirosinaquinases, fosforilam resíduos de tirosina nas caudas intracelulares de receptores como o de IL-2, criando sítios de ancoragem para os STATs. Uma vez fosforilados, os STATs dimerizam e translocam para o núcleo, modulando genes ligados à sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (Parveen *et al.*, 2025).

Essa via é crucial na resposta adaptativa, determinando, por exemplo, o destino de células T CD4 em diferentes subtipos: a IL-2 ativa o STAT1 e promove a homeostase e indução de células T auxiliares do tipo 2 (Th2) (Zhu *et al.*, 2010).

Além disso, NFAT e NF- κ B frequentemente compartilham regiões regulatórias adjacentes ou sobrepostas em genes-alvo, o que permite cooperação ou competição pelo controle transcricional, dependendo do contexto e do estímulo (Huang *et al.*, 2023). A fosforilação de c-Jun pela JNK, crucial para formar o AP-1 funcional, também é altamente sensível à magnitude e à persistência do sinal de Ca^{2+} , que regula quinases a montante como CaMK e PKC, influenciando diretamente a duração da atividade transcricional do AP-1 (Song *et al.*, 2023).

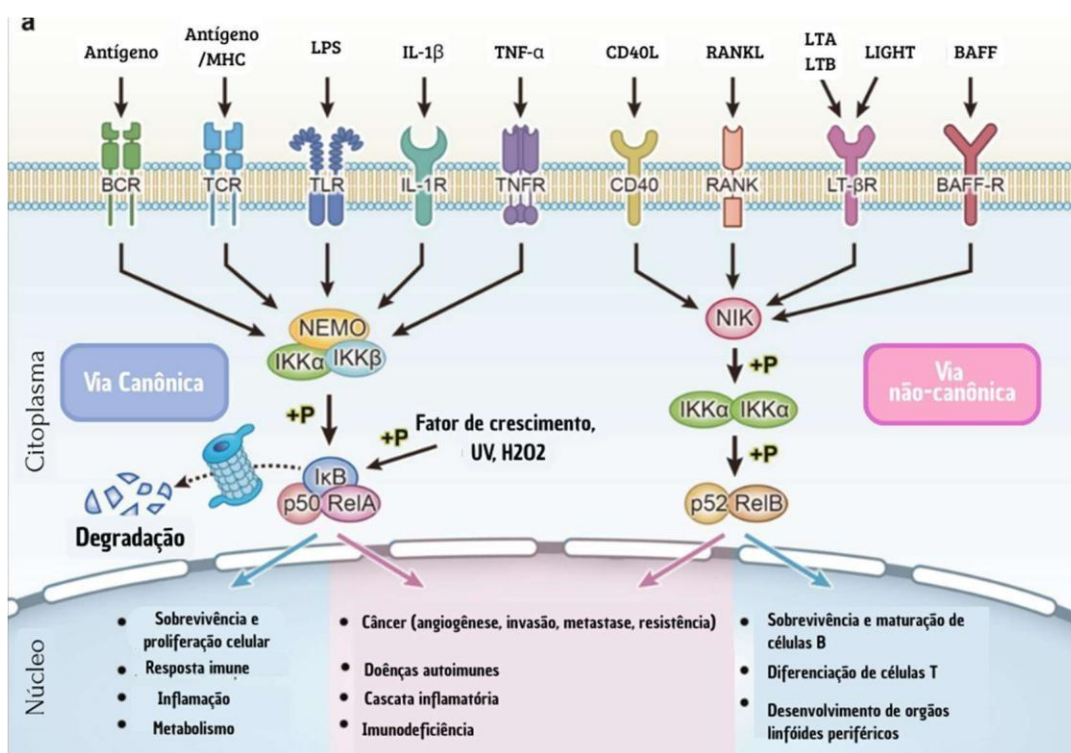


Figura 4. Representação esquemática das vias clássica (canônica) e alternativa de ativação do NF- κ B. Na via clássica, estímulos como TNF- α , IL-1 β e TLRs promovem a ativação do complexo IKK, degradação de I κ B e liberação do dímero p50/RelA, resultando em transcrição gênica associada à inflamação e resposta imune. Na via alternativa, receptores como CD40, BAFF-R e RANK ativam a quinase NIK, levando ao processamento de p100 em p52 e formação do dímero p52/RelB, associado à sobrevivência e maturação linfocitária.

Fonte: Adaptado de Guo *et al.*, 2024

Essa arquitetura de sinalização tem implicações terapêuticas diretas. Inibidores da calcineurina, como ciclosporina e tacrolimus, permanecem amplamente usados em transplantes e doenças autoimunes. Mais recentemente, o desenvolvimento de inibidores seletivos de JAK, antagonistas de IL-6/STAT3 e moduladores de NF- κ B

reforça a necessidade de interferir no equilíbrio dinâmico entre essas vias, em vez de bloquear apenas um único alvo (Hu *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2024).

4.4 Anti-inflamatórios não esteroidais e anti-inflamatórios esteroidais

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), incluindo os não seletivos e os seletivos para COX-2 (COXIBs), são amplamente utilizados no tratamento de inflamação, dor e febre, sendo comuns em doenças como artrite reumatóide e osteoartrite. Sua eficácia decorre da inibição da ciclooxigenase (COX), enzima responsável pela síntese de prostaglandinas e tromboxanos, mediadores chave da inflamação e de funções fisiológicas, como proteção gástrica, regulação do fluxo renal e agregação plaquetária (Kuwano *et al.*, 2004; Bacchi *et al.*, 2012).

Os prostanóides, ou eicosanóides, são moléculas lipídicas derivadas do ácido araquidônico (AA) que atuam de forma autócrina e parácrina. As prostaglandinas e tromboxanos são produtos finais do metabolismo do AA pela via da COX (**Figura 5**) (Smith *et al.*, 2000; Zarghi & Arfaei, 2011). A inibição das isoformas COX-1 e COX-2 pelos AINEs reduz a síntese desses mediadores, sendo a COX-2 responsável pelos sinais de dor, febre e edema, enquanto a COX-1 mantém funções homeostáticas. Apesar da eficácia, o uso prolongado dos AINEs está associado a efeitos adversos significativos, incluindo lesões gastrointestinais (úlceras, sangramentos), disfunção renal e aumento do risco cardiovascular (Bresalier *et al.*, 2005; Harirforoosh *et al.*, 2014).

Em contrapartida, os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), como prednisona e dexametasona, atuam principalmente através do receptor de glicocorticóides (GR), um receptor intracelular que se encontra associado no citoplasma a um complexo multiproteico composto por proteínas chaperonas (Hsp90, Hsp70, Hsp56, Hsp40), cochaperonas (p23), imunofilinas e quinases da via MAPK. Esse complexo mantém o GR em conformação pronta para ligação ao ligante, regulando sua maturação, transporte nuclear e função. Apesar de sua potente ação anti-inflamatória, o uso crônico de AIEs pode resultar em efeitos sistêmicos graves, como supressão adrenal, alterações metabólicas, osteoporose, hipertensão e maior suscetibilidade a infecções, o que reforça a necessidade de explorar novas alternativas terapêuticas seguras (Almawi & Melemedjian, 2002; Wikstrom, 2003; Timmermans, 2019).

Figura 5 - Via do metabolismo do ácido araquidônico.

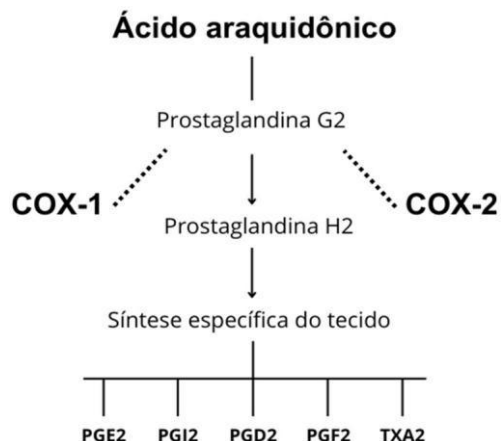


Figura 5. Via do metabolismo do ácido araquidônico. PGE2 - Prostaglandina E2; PGI2, Prostaglandina I2; PGD2 - Prostaglandina D2; TXA2 - Tromboxano A2.

Fonte: Adaptado de Norregaard *et al.*, 2015.

4.5 Produtos naturais

Os produtos naturais ocupam posição de destaque no desenvolvimento de medicamentos devido à sua diversidade química e ao potencial de atender demandas médicas ainda não supridas. Derivados de plantas, microrganismos e organismos marinhos, esses compostos apresentam estruturas únicas que frequentemente servem de inspiração para novos fármacos (Newman & Cragg, 2020).

Historicamente, muitos medicamentos tiveram origem natural, como a penicilina, marco no tratamento de infecções, e o paclitaxel, extraído da *Taxus brevifolia*, importante no combate a diversos tipos de câncer (Newman & Cragg, 2013; Atanasov *et al.*, 2021). Esses exemplos evidenciam o papel central dos produtos naturais no avanço da medicina.

A biodiversidade é fonte de metabólitos secundários com propriedades químicas e biológicas singulares, capazes de interagir com alvos específicos, sendo promissores no tratamento de doenças complexas, como infecções multirresistentes e condições imunomediadas (Chin *et al.*, 2006; Ekiert & Szopa, 2020). Estima-se que mais de 50% dos fármacos aprovados para o tratamento de câncer e de doenças infecciosas tenham origem em produtos naturais (Patridge *et al.*, 2016; Matsumura *et al.*, 2018; Atanasov *et al.*, 2021).

A riqueza estrutural desses compostos permite múltiplas interações biológicas, mantendo-os como uma fonte indispensável de novos fármacos, especialmente para doenças de difícil tratamento. Apesar dos avanços em síntese química e engenharia genética, os produtos naturais continuam sendo fundamentais para o desenvolvimento de terapias eficazes, sobretudo diante da crescente resistência aos tratamentos convencionais (Chaachouay & Zidane, 2024).

4.5.1 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma ampla classe de metabólitos secundários do reino vegetal, presentes em frutas, vegetais, chás e inúmeras outras fontes naturais, com mais de nove mil estruturas identificadas (Panche *et al.*, 2016). Esses compostos compartilham um esqueleto básico C6-C3-C6 e podem ser classificados em flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavononas, flavanóis, antocianinas e chalconas, diferindo pelo grau de oxidação do anel central e pelos padrões de hidroxilação e metoxilação, características que influenciam suas propriedades biológicas (**Figura 7**) (Martínez *et al.*, 2019).

Diversos estudos atribuem aos flavonoides importantes atividades antioxidantes, imunomoduladoras e antimicrobianas, com impacto em patologias crônicas como doenças cardiovasculares, metabólicas, hepáticas e neurodegenerativas (Chen & Gao, 2024; Thebti *et al.*, 2023). Tais efeitos decorrem, em grande parte, da capacidade de bloquear fatores de transcrição pró-inflamatórios, como NF- κ B (**Figura 6**), e de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3, resultando na redução da produção de citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α e IL-17A, além da diminuição da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Martínez *et al.*, 2019).

Estudos experimentais fornecem evidências robustas desses mecanismos, como por exemplo, compostos isolados das folhas de *Dracaena steudneri* inibiram significativamente a liberação de IL-1 β , IL-2, GM-CSF e TNF- α em células mononucleares de sangue periférico humano estimuladas por lipopolissacarídeo, sendo que a presença da dupla ligação C-2/C-3 revelou-se essencial para potencializar a atividade anti-inflamatória (Nchiozem-Ngnitedem *et al.*, 2021). Dentre as subclasses de flavonoides, as flavonas merecem destaque, pois a ausência de

hidroxila em C-3 as diferencia dos flavonóis, influenciando tanto sua biogênese quanto sua farmacologia (Martinez *et al.*, 2019).

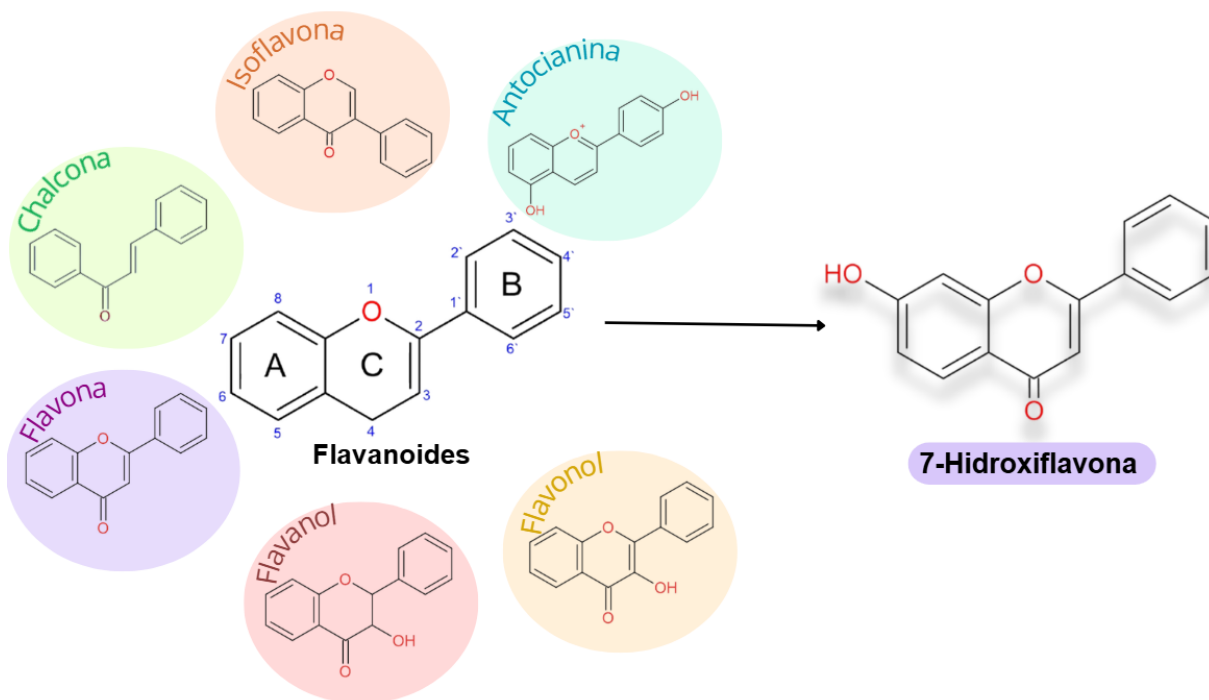


Figura 6. Estruturas químicas representativas das principais classes de flavonoides. Os flavonóides compreendem diferentes subgrupos, incluindo chalconas, isoflavonas, antocianidinas, flavonas, flavanóis e flavonóis, que compartilham um núcleo comum, mas diferem nos padrões de oxigenação e saturação.

Fonte: Autoria própria, 2025.

Dentre as subclasses de flavonoides, as flavonas se destacam pela presença de uma dupla ligação entre C2 e C3 e uma carbonila em C4, características que lhes conferem estabilidade estrutural e diversidade de interações biológicas. Esses compostos apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras amplamente descritas na literatura, especialmente por modular vias de sinalização intracelular como NF- κ B, NFAT e MAPKs. Nesse contexto, a 7-Hidroxi-flavona (7HF) surge como uma molécula promissora, ainda pouco explorada, mas com potencial relevante de regular respostas imunes e inflamatórias. A elucidação de seus mecanismos de ação pode contribuir para a compreensão do papel das flavonas no controle da ativação linfocitária e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas em produtos naturais (Jin *et al.*, 2017; Shamsudin *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2022; Jomova *et al.*, 2025).

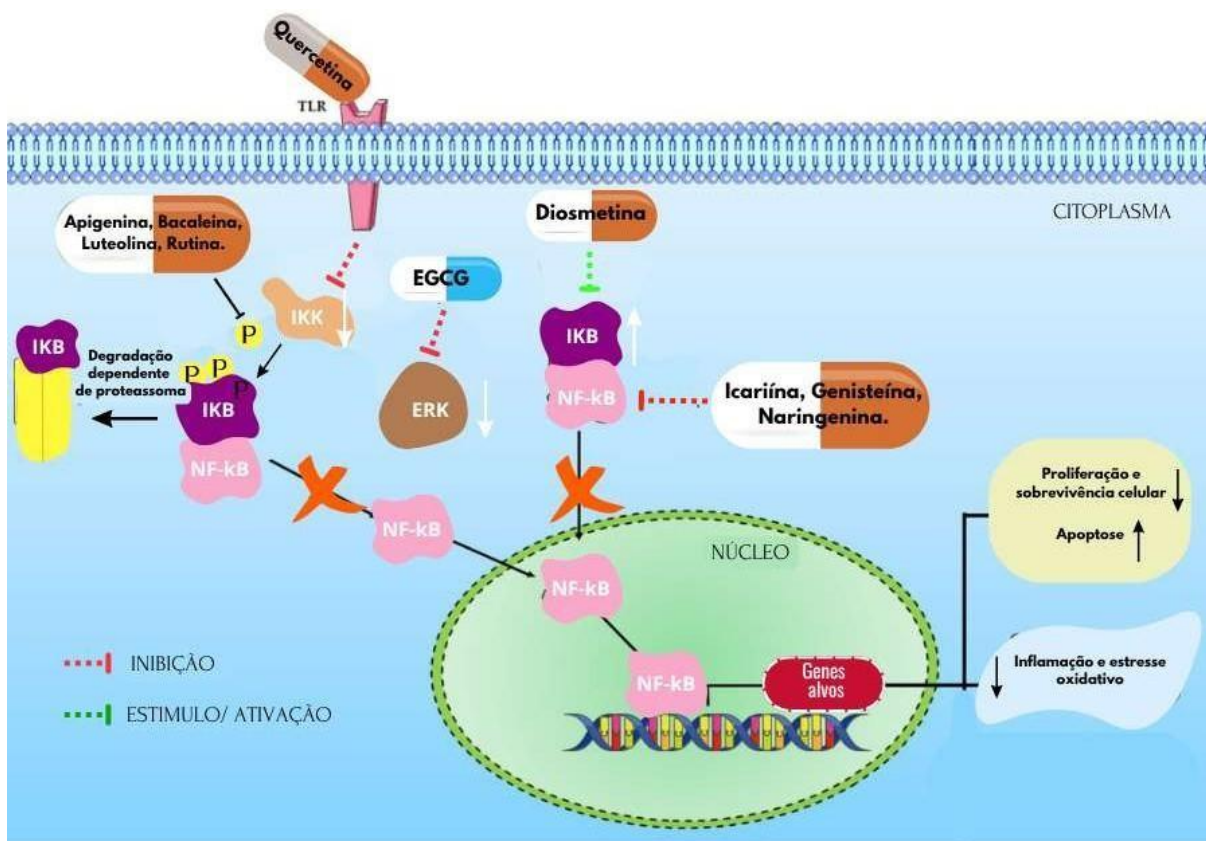


Figura 7. Esquema ilustrativo da via de sinalização do fator de transcrição NF-κB e dos principais pontos de modulação por flavonoides. O estímulo inicial ocorre pela ativação do TLR, que leva à fosforilação da proteína inibitória IκB pelo complexo IKK, resultando em sua degradação dependente de proteassoma e consequente liberação do NF-κB. Esse fator de transcrição transloca-se para o núcleo e induz a expressão de genes envolvidos em proliferação, sobrevivência celular, apoptose, inflamação e estresse oxidativo. Diversos flavonoides atuam em etapas específicas dessa cascata: quercetina inibe a ativação do TLR; apigenina, bacaleína, luteolina e rutina bloqueiam a fosforilação de IκB; EGCG (epigallocatequina) interfere na via ERK; diosmetina estabiliza o complexo IκB/NF-κB; e icariina, genisteína e naringenina dificultam a translocação nuclear do NF-κB.

Fonte: Adaptado de Barreca *et al.*, 2023.

No campo da analgesia, a acetina também se mostrou promissora. Em modelos animais, foi capaz de reduzir comportamentos nociceptivos e inflamatórios, efeitos mediados parcialmente por receptores serotoninérgicos, gabaérgicos e opióides, evidenciando um mecanismo de ação multimodal (Carballo-Villalobos *et al.*, 2014).

Essas evidências reforçam que as flavonas constituem uma classe de compostos bioativos com amplo espectro de atividades biológicas: anti-inflamatórias,

antioxidantes, antinociceptivas, neuroprotetoras e antitumorais (Chagas *et al.*, 2022). Apesar disso, observa-se que a maioria dos estudos se concentra em modelos animais ou em linhagens celulares não linfocitárias, indicando uma lacuna importante no conhecimento. Dessa forma, investigações voltadas para células humanas, em especial linfócitos, são fundamentais para aprofundar a compreensão da atividade imunomoduladora das flavonas e elucidar os mecanismos que sustentam tais efeitos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Molécula em estudo

A 7-Hidroxi-flavona foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; pureza \geq 98%) e foi gentilmente cedida ao nosso grupo de pesquisa pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho da Universidade Federal da Paraíba. Nos ensaios biológicos, a molécula (7HF) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO; Êxodo Científica) e posteriormente em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) para uso nos ensaios *in vitro*. A violeta de genciana (Synth, Diadema, SP) foi utilizada como controle positivo para os ensaios de citotoxicidade. A dexametasona (Sigma-Aldrich) foi utilizada como controle positivo em ensaios de imunomodulação e a mifepristona (RU-486; Sigma-Aldrich) como antagonista do receptor glicocorticoide.

5.2 Ensaios *in silico*

5.2.1 ADMETLab

A análise das propriedades de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) das moléculas foi conduzida por meio da plataforma online ADMETLab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>), que possibilita realizar predições de parâmetros essenciais para o desenvolvimento de novos fármacos. Inicialmente, a estrutura química da molécula foi obtida no formato SMILES e carregada na plataforma. Após o carregamento da estrutura, foram selecionados os parâmetros ADMET a serem analisados. Na categoria de Absorção, foram avaliadas propriedades como permeabilidade intestinal e biodisponibilidade oral. Para a Distribuição, foram analisadas a ligação às proteínas plasmáticas e a capacidade de penetração no sistema nervoso central. Em relação ao Metabolismo, o software previu as principais enzimas envolvidas e suas possíveis interações com os compostos. Para a Excreção, foram avaliadas as principais vias e taxas de eliminação. Quanto à toxicidade, o ADMETLab fornece predições sobre citotoxicidade, mutagenicidade e outros efeitos adversos que poderiam comprometer a segurança do composto. O processamento dessas informações foi realizado por meio de algoritmos de machine learning, que utilizaram dados experimentais de moléculas com perfis semelhantes para gerar as predições.

5.2.2 PROTOX 3.0

A avaliação da toxicidade da molécula foi conduzida por meio da plataforma online PROTOX 3.0 (http://tox.charite.de/protox_3/), que oferece predições de propriedades toxicológicas de substâncias químicas com base em seus perfis moleculares. Inicialmente, a estrutura química do composto foi obtida no formato SMILES e carregada na plataforma. Após o carregamento, foram selecionados os parâmetros de toxicidade a serem analisados, com ênfase naqueles mais relevantes para o estudo. O PROTOX 3.0 forneceu informações sobre diversos aspectos da toxicidade, como toxicidade aguda, mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade hepática, entre outros efeitos adversos. As predições de toxicidade foram geradas utilizando algoritmos de machine learning, que se baseiam em um banco de dados contendo moléculas com informações toxicológicas experimentais. Dessa forma, a plataforma foi capaz de estimar o risco potencial associado à molécula.

5.3 Animais

Camundongos da linhagem BALB/c (4-8 semanas de idade) foram obtidos do biotério do Instituto Gonçalo Moniz (Salvador, Brasil) e alojados em gaiolas esterilizadas sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$), com acesso *ad libitum* a água e uma dieta balanceada para roedores. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (Aprovação nº L-IGM-007/24).

5.4 Ensaio de citotoxicidade em esplenócitos de camundongos BALB/c

Para avaliar a citotoxicidade, baços de camundongos BALB/c foram coletados para obtenção dos esplenócitos, e as suspensões dos esplenócitos foram ressuspendidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; GIBCO) e 1% penicilina-estreptomicina (GIBCO). As células obtidas a partir da suspensão de esplenócitos foram incubadas em placas de 24 poços a uma de 5×10^6 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilinaestreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações da 7HF (10, 20 e 40 μM) ou com dexametasona (10 μM) e violeta de genciana (VG; 10 μM) por 72 horas. Para avaliar a citotoxicidade, as células foram centrifugadas e depois lavadas duas vezes com salina e marcadas com 2 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) por 15 minutos na ausência de luz. As células foram adquiridas no

citômetro de fluxo FACS BD LSRFortessa (Becton Dickinson, San Diego, Califórnia). Foram adquiridos 10.000 eventos e os dados foram analisados no software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

5.5 Ensaio de linfoproliferação em esplenócitos de camundongos BALB/c

Para avaliar o efeito antiproliferativo da molécula, esplenócitos de camundongos BALB/c foram cultivados em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^6 células por poço, em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram estimuladas ou não com concanavalina A (Con A, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma-Aldrich) e tratadas por 72 horas com diferentes concentrações da 7HF (10, 20 e 40 μM) ou com dexametasona (10 μM). Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos para remoção do meio de cultura. Em seguida, 100 μL do reagente CellTiter-Glo[®], um marcador luminescente de viabilidade celular, foi adicionado a cada poço. A luminescência foi medida no leitor de microplacas multimodal de absorbância SpectraMax[®] iD3 (Molecular Devices, San Jose, CA) e o resultado foi expresso em unidades relativas de luz (RLU).

5.6 Dosagem de citocinas em esplenócitos de camundongos BALB/c

Para investigar o efeito da 7HF na produção de citocinas, esplenócitos de camundongos BALB/c foram cultivados em placas de 96 poços, em uma densidade de 1×10^6 células por poço, em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram estimuladas ou não com Con A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tratadas por 24 horas com diferentes concentrações da 7HF (10, 20 e 40 μM) ou com dexametasona (10 μM). Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado, e as concentrações de IL-2 e IFN- γ foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN), conforme as instruções do fabricante.

5.7 Coleta do PBMC

Para a obtenção das PBMC, foi realizada uma coleta de 18 mL de sangue venoso periférico em tubo com heparina, seguindo os procedimentos estabelecidos pela RDC n° 153/2004 com o CEP N° 41.650-010. Em seguida, as células mononucleares foram isoladas por gradiente de Ficoll (Sigma-Aldrich). Após o

isolamento, as células foram estimuladas com fitohemaglutinina (2,5 µg/mL; Sigma-Aldrich) ou mantidas sem estímulo, tratadas ou não com a 7HF e avaliou-se os efeitos *in vitro* dessa molécula.

5.8 Ensaio de hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado com sangue periférico humano coletado em tubos contendo heparina. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado. As hemácias foram lavadas sucessivamente com tampão fosfato salino (PBS 1x), seguido de centrifugação nas mesmas condições, até obtenção de um sobrenadante límpido. Para o ensaio, 100 µL das diferentes concentrações da 7HF, previamente diluídas em solução salina estéril ou PBS, foram incubados com 100 µL de suspensão de eritrócitos (hematócrito ajustado para 1%) em microplacas. As placas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora. Como controle positivo de hemólise, foi utilizada uma solução de saponina a 1% (SigmaAldrich; 0,2 g/10 mL), considerada como 100% de lise eritrocitária, ou solução de 0,5% de Triton-X 100 (Sigma-Aldrich). Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 minutos e, em seguida, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova microplaca de 96 poços com fundo em U. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm.

A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco} \times 100}{\text{absorbância do controle com saponina}}$$

5.9 Citotoxicidade frente a PBMC

Para avaliar a citotoxicidade em células humanas, PBMC coletadas de voluntários foram incubadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1x10⁶ células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações da 7HF (10, 20 e 40 µM) ou com dexametasona (10 µM) por 72 horas e violeta de genciana (VG; 10 µM). Para avaliar a citotoxicidade, as células foram centrifugadas e depois lavadas

duas vezes com PBS e marcada com 2 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) por 15 minutos na ausência de luz. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS BD LSRFortessa. Foram adquiridos 10.000 eventos e os dados foram analisados no software FlowJo.

5.10 Ensaio de linfoproliferação em PBMC

Para avaliar o efeito antiproliferativo das moléculas as células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 3×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina-estreptomicina. As células foram estimuladas ou não com fitohemaglutinina (PHA) (2,5 µg/mL) e tratadas com diferentes concentrações da 7HF (10, 20 e 40 µM), ou com dexametasona (10 µM) e Mifepristona (RU486) inibidor do receptor glicocorticoide (10 µM) por 72 horas. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, o meio de cultura foi removido e 100 µL do reagente CellTiter-Glo®, um marcador luminescente de viabilidade celular, foi adicionado a cada poço. A luminescência foi quantificada usando o SpectraMax® iD3 e o resultado expresso em RLU.

5.11 Dosagem de citocinas em PBMC

Para avaliar o efeito da 7HF sobre a produção de citocinas, PBMC foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 3×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilinaestreptomicina. As células foram estimuladas ou não com PHA (2,5 µg/mL) e tratadas com diferentes concentrações da 7HF (10, 20 e 40 µM) ou com dexametasona (10 µM) por 24 horas. O sobrenadante foi coletado e as citocinas IL-2 e IFN-γ foram dosadas por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits DuoSet da R&D Systems, de acordo com as instruções do fabricante.

5.12 Análise da expressão gênica - Via do NFAT - GR

O RNA foi extraído de PBMC, que foram previamente tratadas ou não com a 7HF (40 µM) por 3 horas, e subsequentemente estimuladas ou não com PHA (2,5 µg/mL) por 3 horas. A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR). A síntese de cDNA foi feita com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). O qPCR foi preparado

com o Sybr™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os ensaios de qRT-PCR foram conduzidos para avaliar os níveis de expressão de *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3CC*, *CALM1*, *CALM2*, *CALM3*, *NFAT1*, *NFAT2*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *AKT2*, *SGK1*, *STAT5A*, *STAT6*, *IL2*, *IL2RA*, *IL6*, *IFNG*, *PTGS2*, *IKBA*, *IKBB*, *DUSP1*, *FKBP5*, *TSC22D3*, *JUN*, *FOS*, and *PLCG1* (**Quadro 1, pg. 55**). Todas as reações foram realizadas em triplicata utilizando o sistema de PCR em Tempo Real ABI 7500 (Applied Biosystems), sob condições de ciclagem térmica padrão. Foram incluídos um controle sem molde (NTC) e controles sem transcrição reversa (No-RT). As amostras foram normalizadas com o gene *GAPDH*. A análise dos resultados foi realizada pelo método de ciclo limite ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de PCR comparativo, conforme descrito por Schmittgen & Livak (2008). A matriz de expressão normalizada foi transformada em \log_2 e cada gene foi padronizado usando a normalização por escore z entre as amostras para destacar os padrões de expressão relativa. O conjunto de dados resultante foi visualizado como um mapa de calor agrupado gerado no Microsoft Excel (Microsoft 365; Microsoft Corporation, Redmond, WA) usando um gradiente de cores azul-amarelo-vermelho, onde o azul indica baixa expressão, o amarelo indica expressão média e o vermelho indica altos níveis de expressão.

5.13 Ancoramento (docking) Molecular

5.13.1. Estruturas dos ligantes e proteínas

As estruturas da dexametasona e da 7HF foram obtidas no banco de dados PubChem (Kim *et al.*, 2025), sob os CIDs 5743 e 5281894, respectivamente. As estruturas das proteínas foram obtidas no Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000), sob os Ids PDB: 1MF8 (calcineurina) (Jin & Harrison, 2002) e 1NHZ (receptor glicocorticóide) (Kauppi *et al.*, 2003).

5.13.2 Docking Molecular

As simulações de docking molecular foram realizadas com o software GOLD 2025.1.0, um programa de ancoragem proteína–ligante baseado em algoritmo genético (GA) (Jones *et al.*, 1997). Foi utilizada a função de pontuação ChemPLP (Korb *et al.*, 2009), bem como os parâmetros padrão do GA. Essa função de pontuação não possui uma unidade física, como kcal/mol. O valor obtido é uma pontuação empírica, ou seja, um número adimensional usado para classificar e

ranquear as poses de ancoragem entre um ligante e uma proteína. Para determinar o sítio de ligação onde a dexametasona e a 7HF foram ancoradas à calcineurina, foi definida uma esfera com raio igual a 10 Å, tendo como centro geométrico o da ciclosporina A co-cristalizada ($x = -36,05$ Å; $y = 16,68$ Å; $z = 21,64$ Å). Já para determinar o sítio de ligação do receptor glicocorticóide, foi utilizada uma esfera com o mesmo raio (10 Å), definida com base no centro geométrico do antagonista RU-486 co-cristalizado ($x = -2,24$ Å; $y = 12,42$ Å; $z = 3,40$ Å). Além disso, para o receptor glicocorticóide, uma molécula de água com centro geométrico em $x = -2,32$ Å, $y = 7,00$ Å e $z = 5,18$ Å foi mantida no sistema.

5.13.3 Ferramentas de Visualização

As visualizações moleculares foram realizadas utilizando os softwares BIOVIA Discovery Studio 2021 (BIOVIA, 2021) e SAMSON 2025 R3 (9.0.0) (SAMSON, sd).

5.14 Análise estatística

A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada utilizando o teste oneway ANOVA. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Diferenças foram consideradas significativas quando os valores de p foram $< 0,05$.

SIGLA	NOME DO GENE	SEQUÊNCIA (FORWARD/REVERSE)	SIGLA	NOME DO GENE	SEQUÊNCIA (FORWARD/REVERSE)
PPP3CA	Subunidade catalítica alfa isoforma da proteína	GCCCTGATGAACCA ACAGTTCC / GCAGGTGGTTCTTT GAATCGGTC	FOS	Proteína que faz parte do complexo AP-1	TGCTCACGAGATTAGG ACACGC/ GCCTTACCTGCGCGTT GACA
PPP3CB	Subunidade catalítica beta isoforma da proteína	CTTGGCGATTATGTG GACAGAGG / GGTGTCTGCATTCAT GTTGCC	TSC22D3	Proteína 3 da família de domínios TSC22	CCTTGCCACTCACTCC GAAGC/ TCAAGTGAACAGAAG GATGGTGTCC
PPP3CC	Subunidade catalítica gama isoforma da proteína	GCGAAAATGGGCGG TTAGCA / CTCCCGGACATGGT CCCCTC	SGK-1	SGK, quinase 1 regulada por soro/glicocorticoide	GGAAATTACAGCAGGA TTTTCATGGT/ GAAATGGTCTTGCAAT GACTCGTAT
IKBa	Proteína inibidora do fator nuclear Kappa B na via canônica	TCCACTCCATCCTGA AGGCTAC / CAAGGACACCAAAA GCTCCACG	FKBP5	Codifica a proteína FKBP Prolil Isomerase 5	AGGATGATACTGTCCA TTGCCGA/ TCCACAGACATCTTTC AACCACCTT
IKBb	Proteína inibidora do fator nuclear Kappa B na via não canônica	TCTTCGGCTACGTCA CTGAGGA / TGCAGGTCCATGTAC TCAGTGC	DUSP-1	Proteína fosfatase 1 de especificidade dupla	ACACATTCTGCAGGCC CTTGTC/ CTCAGTGTGTGATCCG GTTTCTTTT
NFAT1	Fator nuclear de células T ativadas 1	GATAGTGGGCAACA CCAAAGTCC / TCTCGCCTTCCGCA GCTCAAT	STAT6	Sinalizador e ativador de transcrição 6	GTGTGGAGCCATACGT AGATGTCA/ GGCAGGAACATACAGA CACATTTAC

NFAT2	Fator nuclear de células T ativadas 2	CACCAAAGTCCTGG AGATCCCA / TTCTTCCTCCCGATG TCCGTCT	PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5- bisfosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa	AGCACCTGAATAGGCA AGTCG/ GAGCATC CATGAAATCTGGTCGC
IL-2	Interleucina 2	GAATGGAATTAATAAT TACAAGAATC / ATGTTGTTTCAGATC CCTTAGTCCAGA	PIK3CB	Fosfatidilinositol-4,5- bisfosfato 3-quinase subunidade catalítica beta	GGTAATCGGAGGATAG GGCAGT/ CGGCAGTATGCTTCAA GGATGAC
IFN-γ	Interferon Gama	TCTGCATCGTTTTGG GTTCT / GCAGGCAGGACAAC CATTACT	IL-6	Interleucina 6	GCGATGGAGTCAGAG GAAACTCA/ CAGGGCTAAGGATTC CTGCACTT
PLCG1	Fosfolipase C gama 1	CATCACGCACTACCA GCAGGTG / GACGCGCATTAGCAT GTGCTCA	PTGS2	Ciclooxigenase 2	AGGGCCAGTCCTAGTT TTGAATA/ GTGGATGCTTCGTTAA TTTGTTCAAG
JUN	Proteína que faz parte do complexo AP-1	CAGCAATGTTAACCT CAGCAACTAA/CGAT TA AAATCACTCTCAGTG CTTCTT	GAPDH	Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase	CTGGGCTACACTGAG CACC / AAGTGGTCGTTGAGG GCAATG

Quadro 1. Lista dos genes analisados e respectivas sequências de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados nas reações de qRT-PCR. O quadro apresenta a sigla e o nome completo de cada gene, bem como as sequências dos primers *forward* e *reverse*, empregados para a amplificação de genes envolvidos nas vias de sinalização do NFAT, NF-κB, AP-1, PI3K/AKT, resposta inflamatória, sinalização por glicocorticoides e controle transcricional. O gene **GAPDH** foi utilizado como controle endógeno para normalização da expressão gênica.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação da atividade *in silico* dos isômeros da flavona

6.1.1 ADMETLab

O radar de propriedades do ADMETLab se destaca como uma ferramenta valiosa para a avaliação rápida e visual das características de compostos químicos. Sua aplicação é especialmente útil em diversas etapas do processo de descoberta de fármacos, desde a seleção inicial de compostos até a otimização dos candidatos. Além disso, ao integrar parâmetros essenciais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, o radar facilita a triagem de compostos com maior potencial terapêutico (Fu *et al.*, 2024).

A regra de Lipinski prediz se a molécula em estudo possui ou não características promissoras para se tornar um fármaco, comparando com os seus descritores: $\text{miLog P} = \text{Log P}$: coeficiente de partição octanol-água; PM: Peso Molecular; SDLH: Sítios Doadores de Ligações de Hidrogênio; SALH: Sítios Aceptores de Ligações de Hidrogênio; TPSA: Área Topológica Superficial Polar; NLR: Número de Ligações Rotacionáveis e VM: Volume Molecular. Abaixo, a **Quadro 2** revela os valores dos descritores para a 7HF.

Composto	miLogP	PM;	SDLH	SALH	TPSA	Violações
7HF	3,466	238,06	3	1	50,44	0

Quadro 2. Parâmetros físico-químicos utilizados para avaliação do perfil de biodisponibilidade oral da 7-hidroxi flavona (7HF). São apresentados os valores de miLogP (coeficiente de partição), PM (peso molecular), SDLH (doadores de ligação de hidrogênio), SALH (acceptores de ligação de hidrogênio), TPSA (superfície polar topológica) e o número de violações às regras de Lipinski.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

Os resultados demonstraram que a 7-hidroxi flavona (7HF) (**Quadro 2**) atende aos critérios da regra dos cinco de Lipinski, a qual estabelece que um bom candidato a fármaco de uso oral deve apresentar: $\text{LogP} \leq 5$, peso molecular (PM) ≤ 500 Da, número de doadores de ligação de hidrogênio (SDLH) ≤ 5 , número de aceitadores de ligação de hidrogênio (SALH) ≤ 10 e polaridade (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$.

De forma complementar, o ADMETLab também apresenta os resultados em forma de um radar de biodisponibilidade (**Figura 8**), confirmando que a 7HF está dentro da zona favorável para maioria dos parâmetros, sugerindo um bom potencial de biodisponibilidade oral. Entretanto, observou-se um pequeno desvio no valor do LogP, que está diretamente ligado à lipofilicidade da molécula. Esse parâmetro é de grande relevância na descoberta de novos candidatos a fármacos, pois constitui uma das propriedades físico-químicas mais informativas na química medicinal (Arnott & Planey, 2012).

A lipofilicidade influencia diretamente as características ADMET, impactando na solubilidade e na permeabilidade pelas membranas celulares (Waring, 2009; Liu *et al.*, 2011), além de afetar a seletividade e potência (Gleeson *et al.*, 2011). Valores elevados estão associados a uma taxa de metabolização mais rápida, o que pode reduzir o tempo de meia-vida plasmática do composto e comprometer sua eficácia terapêutica (Arnott & Planey, 2012).

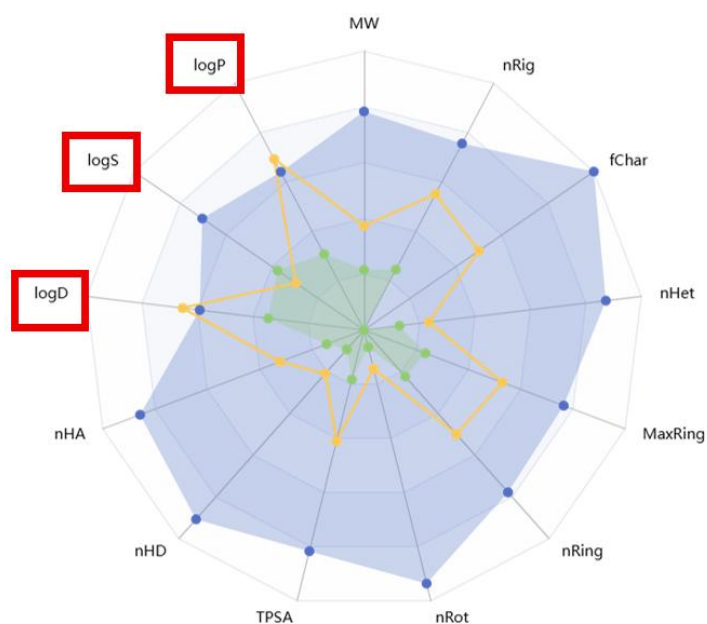


Figura 8. Perfil físico-químico da 7HF. O gráfico radar apresenta as propriedades de cada composto em relação a limites pré-definidos, facilitando a identificação de moléculas com características favoráveis para o desenvolvimento de novos fármacos. Os limites inferiores são indicados em verde, os limites superiores em azul, e a 7HF em laranja. Bons candidatos a fármacos apresentam valores acima do limite inferior e abaixo do limite superior.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

Uma alternativa promissora para contornar essas limitações farmacocinéticas é o nanoencapsulamento, que pode modificar propriedades como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Essa técnica reduz o LogP, facilitando a absorção do composto, além de criar uma barreira protetora entre a molécula e o meio aquoso, aumentando sua solubilidade e diminuindo interações indesejadas com lipídios corporais. Adicionalmente, o nanoencapsulamento possibilita a liberação controlada e direcionada do fármaco em locais específicos, como células tumorais, reduzindo toxicidade sistêmica, metabolização precoce e potenciais danos a órgãos vitais (Xi *et al.*, 2017; Begines *et al.*, 2020).

Após a realização da predição farmacocinética da 7HF para a biodisponibilidade oral, foi realizada a predição para os seguintes descritores: Absorção Intestinal Humana (HIA), permeabilidade pela barreira hematoencefálica (BBB), permeabilidade pelas células epiteliais Caco-2 e permeabilidade em células MDCK (**Quadro 3**).

Os processos de absorção estão diretamente ligados à permeação de compostos através das membranas biológicas. O transporte de fármacos para o interior da membrana intestinal é dinâmico e complexo, sendo afetado por fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal (TGI), além das características físico-químicas do fármaco e influência da forma farmacêutica e seus excipientes (Souza *et al.*, 2007).

Os modelos celulares Caco-2 (nm/s) e MDCK (nm/s) têm sido amplamente utilizados como sistemas *in vitro* confiáveis para prever a absorção de fármacos por via oral. As células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma de cólon humano, apresentam diversas rotas de transporte de medicamentos através do epitélio intestinal (Yee, 2013). Estes modelos auxiliam na pesquisa de moléculas com potencial terapêutico, pois permitem prever sua absorção *in vivo*, contribuindo para a triagem de compostos antes dos estudos pré-clínicos. O modelo também pode ser empregado pela indústria farmacêutica na descoberta de novos fármacos ou integrado a métodos de dissolução para predizer a relação entre dissolução e absorção (Neuhoff *et al.*, 2005). No caso da 7HF, o resultado de absorção em células Caco-2 indica que o composto é bem absorvido.

PARÂMETROS	RESULTADO	VALOR DE REFERÊNCIA	INTERPRETAÇÃO
MDCK	0,0 cm/s	> 20 x 10 ⁻⁶ cm/s (alta), 2-20 x 10 ⁻⁶ cm/s, (média) < 2 x 10 ⁻⁶ cm/s (baixa)	Baixa permeabilidade
Caco-2	- 4,862 cm/s	> -5,15log cm/s	Alta permeabilidade
HIA%	0 -0,3	0 – 0,3 (alta), 0,3 – 0,7 (média) e 0,7 – 1 (baixa)	Alta absorção intestinal
PP%	98%	≤ 90%: excelente	Alta ligação a proteínas plasmáticas
BHE	0 -0,3	0 – 0,3 (alta), 0,3 – 0,7 (média) e 0,7 – 1 (baixa)	Alta penetração na barreira hematoencefálica
CYPs	Inibe a CYP1A2, CYP2C9	-----	Pode interferir no metabolismo de fármacos via essas CYPs
Plasma CL	5,371 ml/min/kg	<5 baixa /5 – 15 média / >15 alta	Depuração moderada
T1/2	1,248h	<1h ultracurta/ 1-4hrs curta/ 4-8hrs intermediária/ > 8hrs longa	Meia vida curta

Quadro 3. Predições farmacocinéticas para a 7HF. MDCK - células de rim de cachorro beagle; Caco2 - células de adenocarcinoma colorretal humano; HIA - absorção intestinal humana; PP - ligação às proteínas plasmáticas; BHE - barreira hematoencefálica, CYPs - Citocromo P450, Plasma PL – Depuração Plasmática, T1/2 – Tempo de meia vida.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

O modelo celular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) consiste em células de rim canino que, quando cultivadas em membranas semipermeáveis, se diferenciam em epitélio colunar com junções semelhantes às células Caco-2. Além disso, as células MDCK são amplamente empregadas para estudar a fisiologia do túbulo distal renal, incluindo o transporte de íons como Na^+ e Cl^- , cuja reabsorção é parcialmente regulada por co-transportadores. Este modelo expressa níveis adequados desses transportadores, sendo relevante para o estudo de diuréticos tiazídicos utilizados no tratamento da hipertensão (De Jong *et al.*, 2003).

Irvine *et al.* (1999) destacam que o sistema MDCK é uma ferramenta confiável para triagem rápida de permeabilidade. No caso da 7HF, o composto apresentou baixa permeabilidade, indicando dificuldade em atravessar as células MDCK e sugerindo que sua passagem por barreiras biológicas pode ser limitada.

A propriedade molecular HIA está relacionada com a dissolução, dissociação dos compostos e permeabilidade intestinal, fatores limitantes na taxa de absorção dos princípios ativos administrados por via oral (Polli *et al.*, 1996). A HIA indica a somatória da taxa de absorção intestinal com a biodisponibilidade da fração inalterada do composto que alcança a circulação sistêmica. É importante salientar que, quando administrado por via oral, a concentração plasmática será sempre inferior a 100%, devido à perda no processo de absorção intestinal e à eliminação pelo metabolismo hepático (Wang *et al.*, 2015).

No caso da 7HF, a absorção intestinal foi considerada alta, compatível com a elevada permeabilidade observada em células Caco-2. De forma semelhante, outras flavonas amplamente estudadas apresentaram perfil absorptivo comparável, como a luteolina, com predição positiva de permeabilidade em células Caco-2 (74,6%), e a apigenina, que exibiu elevada permeabilidade intestinal predita (93,1%). Esses resultados, assim como os observados para a crisina, indicam um comportamento absorptivo equivalente entre esses compostos flavonoídicos, reforçando a similaridade do perfil farmacocinético da 7HF em relação a flavonas bioativas já descritas na literatura (Motta *et al.*, 2023).

Outro parâmetro avaliado foi a Barreira Hematoencefálica (BBB), que reflete a capacidade de um composto atravessar as células endoteliais do sistema nervoso

central (SNC) e, assim, indica a restrição ou facilidade de penetração do fármaco na corrente sanguínea em direção ao cérebro (Sharma *et al.*, 2016; Dolabella *et al.*, 2018;

Kanazawa, 2018). A permeabilidade à BBB é um fator crítico na descoberta de novos fármacos, pois compostos com alta capacidade de atravessar essa barreira podem exercer efeitos terapêuticos no SNC, enquanto compostos com baixa permeabilidade apresentam ação restrita a órgãos periféricos (Pardridge, 2012). No caso da 7HF, a predição indicou alta probabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sugerindo que o composto pode alcançar concentrações eficazes no SNC, o que é relevante para potenciais aplicações neurológicas.

Além da absorção e distribuição, a excreção constitui outro parâmetro fundamental da farmacocinética e foi também avaliada *in silico*. A análise da excreção permite prever como os compostos serão eliminados do organismo, principalmente por via renal (urinária) e biliar, sem a necessidade de testes em animais ou humanos nas fases iniciais de pesquisa. Compreender esses processos é crucial para otimizar a eficácia terapêutica, reduzir o risco de toxicidade e aumentar a segurança do tratamento, além de auxiliar na identificação precoce de compostos com perfil de eliminação desfavorável, orientando ajustes estruturais ou estratégias de formulação para melhorar o desempenho farmacológico (Wang *et al.*, 2015).

Um parâmetro importante nesse processo é a depuração plasmática (CL), que indica a rapidez com a qual um fármaco é removido do corpo. O ADMETLab utiliza modelos computacionais baseados em características moleculares do composto para prever seu comportamento em relação à absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Esses parâmetros fornecem uma estimativa fundamental para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros, permitindo ajustes necessários nas propriedades dos compostos desde o início da pesquisa (Motta *et al.*, 2023).

A 7HF apresentou depuração plasmática (Plasma CL) moderada, indicando que o composto é eliminado do organismo a uma taxa intermediária — nem muito rápida, nem muito lenta. Esse parâmetro influencia diretamente a meia-vida ($T_{1/2}$) do fármaco, que é inversamente proporcional ao clearance. Um clearance médio ajuda a manter a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica por mais tempo, com

menores variações nos níveis plasmáticos, proporcionando um equilíbrio entre eficácia terapêutica e risco de toxicidade. Dessa forma, medicamentos com depuração moderada tendem a apresentar meia-vida intermediária, permitindo regimes de administração mais práticos, como doses diárias, sem necessidade de ajustes frequentes, embora seja fundamental monitoramento em pacientes com comorbidades para garantir a segurança (Jung *et al.*, 2024). O parâmetro T_{1/2} é essencial para compreender o comportamento do fármaco no organismo, estando diretamente relacionado à depuração e ao volume de distribuição. No contexto da avaliação *in silico* realizada pelo ADMETLab, a T_{1/2} permite prever a duração da ação do fármaco, a frequência de dosagem e possíveis interações medicamentosas. No caso da 7HF, a meia-vida foi classificada como curta, indicando eliminação relativamente rápida do organismo. Esse perfil pode ser vantajoso em situações que exigem controle da toxicidade ou minimização do risco de acúmulo do fármaco, especialmente em pacientes com função renal ou hepática comprometida (Yuan *et al.*, 2015).

Além de influenciar a duração de ação e a frequência de dosagem, o perfil farmacocinético da 7HF também pode ser modulado pela sua capacidade de inibir enzimas metabolizadoras, como a CYP1A2 e a CYP2C9, o que impacta diretamente a eliminação e o potencial de interações medicamentosas (Guengerich, 2008; Zhou *et al.*, 2010).

A 7HF apresentou potencial de inibição das enzimas CYP1A2 e CYP2C9, entre outras CYPs. As enzimas CYP (citocromo P450) desempenham um papel central no metabolismo de fármacos, catalisando reações de oxidação que transformam os compostos em metabólitos mais solúveis para excreção (Guengerich, 2008). A inibição de CYPs pode resultar em interações medicamentosas, uma vez que compostos administrados simultaneamente podem competir pela mesma enzima, alterando a taxa de metabolismo e causando aumento ou redução das concentrações plasmáticas do fármaco (Zhou *et al.*, 2010).

A análise de predição da toxicidade (**Quadro 4**) indicou que a 7-hidroxi flavona (7HF) apresenta um perfil misto de toxicidade quando avaliada em escala de 0 a 1, na qual valores próximos de 1 correspondem a maior risco. Os escores para toxicidade hematológica (0,134) e nefrotoxicidade (0,193) foram baixos, sugerindo

probabilidade reduzida de efeitos adversos nessas vias. Em contraste, observaram-se valores intermediários para mutagenicidade no teste de AMES (0,595) e para bloqueio do canal hERG (0,481), indicando atenção a possíveis efeitos genotóxicos e arritmogênicos. A toxicidade aguda ($LD_{50} = 0,469$) e a hepatotoxicidade (0,451) ficaram em faixa moderada, comparáveis a flavonas amplamente estudadas, como apigenina e luteolina, que em modelos *in silico* costumam apresentar predições $\leq 0,4$ para esses parâmetros (Braun & Newman, 2019).

Contudo, os escores de lesão hepática induzida por fármacos (DILI = 0,833) e de carcinogenicidade IARC (0,821) foram consideravelmente elevados, superando os relatados para flavonas simples analisadas por Montenegro *et al.*, 2017, que geralmente permanecem abaixo de 0,5. Esses achados sugerem que a 7HF pode ter características estruturais que aumentem o risco de dano hepático e potencial carcinogênico, mesmo dentro da mesma classe de flavonas, ressaltando a necessidade de validação por ensaios *in vitro* e *in vivo*. Vale salientar que a escala de 0 a 1 utilizada nas plataformas ADMET é interpretativa e não substitui avaliação experimental, servindo como ferramenta preliminar para priorização de estudos (Daina *et al.*, 2017).

TOXICIDADE							
HEMATO	AMES TEST	IHERG	LD50	NEFRO	HEPATO	DILI	IARC
0,134	0,595	0,481	0,469	0,19	0,451	0,833	0,821

Quadro 4. Predição *in silico* dos parâmetros de toxicidade da 7-hidroxiavona (7HF). São apresentados os valores preditos para toxicidade hematológica (HEMATO), mutagenicidade (AMES test), inibição do canal iHERG, toxicidade aguda (LD50), nefrotoxicidade (NEFRO), hepatotoxicidade (HEPATO), toxicidade hepática induzida por fármacos (DILI) e potencial carcinogênico (IARC).

Fonte: Autoria Própria, 2025.

6.1.2 PROTOX 3.0

O PROTOX 3.0 é uma plataforma online avançada voltada para a predição de toxicidade de compostos químicos com base em suas propriedades moleculares. Esta ferramenta tem se consolidado como um recurso importante na farmacologia e na toxicologia computacional, permitindo previsões rápidas e precisas sobre os riscos toxicológicos potenciais de novas moléculas. Sua aplicação é especialmente

relevante na triagem inicial de compostos durante o desenvolvimento de fármacos, auxiliando na identificação de moléculas com perfil de segurança favorável antes de ensaios experimentais mais complexos (Banerjee *et al.*, 2024).

O software avalia a interação de moléculas com diversas isoenzimas do sistema CYP450 (CYPs), localizadas principalmente no fígado, que realizam a biotransformação de compostos endógenos e exógenos (Zhao *et al.*, 2021). Entre as isoenzimas analisadas pelo PROTOX 3.0 estão CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4.

No caso da 7HF (**Figura 9**), observou-se ausência de inibição das enzimas CYP2E1 e CYP2D6, que desempenham papéis críticos na ativação e inativação de xenobióticos, bem como no metabolismo de antidepressivos, antipsicóticos e opioides. A manutenção da atividade dessas enzimas é vantajosa em contextos inflamatórios, pois elas participam da sinalização e da eliminação de mediadores pró-inflamatórios (Ranneh *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2018; Manoharam *et al.*, 2024).

Por outro lado, a 7HF apresentou interação predita com as isoformas CYP1A2 e CYP2C9, indicando potencial modulação funcional dessas enzimas. A CYP1A2 é responsável pelo metabolismo de compostos como cafeína, teofilina e diversos fármacos, e sua expressão pode ser modulada por citocinas inflamatórias, incluindo TNF α e IL-1 β (Ranneh *et al.*, 2017; Lenoir *et al.*, 2021; Manoharam *et al.*, 2024). Já a CYP2C9 participa do metabolismo do ácido araquidônico e de fármacos específicos; sua ativação pode promover a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, contribuindo para a potenciação de respostas inflamatórias (De Jong *et al.*, 2020).

A ativação da CYP1A2 pela 7HF sugere um possível acúmulo de fármacos metabolizados por essa isoenzima, como clozapina e certos antidepressivos, o que aumenta o risco de toxicidade. Estratégias de mitigação incluem ajustes de dose, monitoramento rigoroso dos níveis plasmáticos e, quando viável, a utilização de alternativas terapêuticas que não dependam da CYP1A2.

De forma comparativa, outras flavonas, como a apigenina e a luteolina, também interagem com isoenzimas do CYP450, apresentando padrões variados de inibição ou ativação (Chen *et al.*, 2016). Essas diferenças estruturais entre flavonas influenciam diretamente seus perfis de metabolização e segurança, reforçando a

importância de análises computacionais como as fornecidas pelo PROTOX 3.0 durante o desenvolvimento de novos compostos bioativos.

Nesse cenário, a avaliação preditiva da 7HF torna-se particularmente relevante, pois permite verificar não apenas seu perfil metabólico, mas também potenciais riscos toxicológicos associados ao seu uso.

É importante salientar que os endpoints críticos relacionados à carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade foram preditos como inativos, com elevadas probabilidades de segurança (quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade) (**Quadro 5**), o que reforça o potencial da 7HF como molécula bioativa relativamente segura para estudos pré-clínicos. No entanto, a toxicidade em órgãos específicos — particularmente rins e pulmões — deve ser investigada em modelos *in vitro* e *in vivo*, pois estudos prévios com flavonas demonstraram que efeitos adversos podem ser organoespecíficos, mesmo quando outros parâmetros sistêmicos sugerem segurança (Ranneh *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2018).

Em síntese, os resultados sugerem que a 7HF apresenta um perfil de segurança compatível com aplicações farmacológicas, mas destacam a necessidade de estudos complementares de toxicidade renal e respiratória, bem como avaliações de toxicidade nutricional e clínica, para confirmar as predições computacionais e garantir sua segurança em diferentes contextos terapêuticos (**Quadro 5**).

Além das isoenzimas, o PROTOX também avalia o potencial de ativação ou inibição de receptores celulares, fatores de transcrição e enzimas envolvidos em processos biológicos essenciais, como metabolismo, resposta inflamatória, modulação hormonal e ativação de vias de sinalização (**Figura 10**). Para a 7HF, foram observadas possíveis ativações de AhR, AR-LBD, ER/ER-LBD, MMP e aromatase. Esses alvos moleculares estão diretamente associados à modulação de respostas biológicas, exercendo influência significativa sobre mecanismos de toxicidade e inflamação (Rakateli *et al.*, 2023).

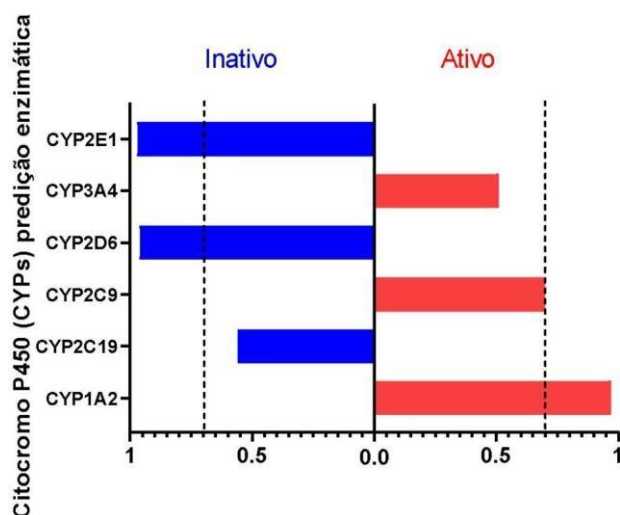


Figura 9. Predição da atividade de isoenzimas do citocromo P450 (CYP) para a 7HF. As barras ilustram a probabilidade de inibição de cada isoenzima CYP. Valores próximos de 1 indicam uma maior probabilidade de inibição. Observa-se que as isoenzimas CYP2C9 e CYP1A2 possuem alta probabilidade de inibição em todos os isômeros, enquanto as demais isoenzimas apresentam uma probabilidade baixa.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

Toxicidade de órgãos ou endpoints de toxicidade	Predição	Probabilidade
Hepatotoxicidade	Inativo	0,65
Neurotoxicidade	Inativo	0,77
Nefrotoxicidade	Ativo	0,57
Toxicidade respiratória	Ativo	0,79
Cardiotoxicidade	Inativo	0,67
Carcinogenicidade	Inativo	0,50

Imunotoxicidade	Inativo	0,98
Mutagenicidade	Inativo	0,60
Citotoxicidade	Inativo	0,71
BHE	Ativo	0,55
Ecotoxicidade	Ativo	0,57
Toxicidade clínica	Ativo	0,58
Toxicidade nutricional	Ativo	0,73

Quadro 5. Predições de toxicidade em órgãos e sistemas da 7-hidroxi flavona (7HF), obtidas por análise *in silico* na plataforma PROTOX 3.0. São apresentadas as probabilidades associadas à predição de atividade (ativo/inativo) para cada tipo de toxicidade avaliada.

Fonte: Autoria Própria, 2025.

O AhR, por exemplo, regula o metabolismo de xenobióticos e a resposta a compostos tóxicos, além de controlar genes antioxidantes. Sua ativação, embora importante para a defesa celular, pode também estar relacionada a processos inflamatórios, cânceres e doenças metabólicas, ao favorecer a resposta inflamatória e comprometer a proteção contra o estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2021).

De forma semelhante, a ativação dos receptores AR-LBD e ER/ER-LBD está intimamente ligada ao controle hormonal e ao desenvolvimento de cânceres hormonais. Enquanto o AR-LBD pode induzir distúrbios hormonais e câncer de próstata, os receptores de estrogênio estão associados ao câncer de mama e a alterações endócrinas que amplificam respostas inflamatórias. Nesse mesmo eixo, as metaloproteinases (MMPs) desempenham papel crucial na remodelação da matriz extracelular e na migração celular, processos que, quando exacerbados, favorecem a invasão tumoral e a progressão de doenças inflamatórias e neoplásicas. Já a aromatase, ao converter andrógenos em estrogênio, pode alterar o equilíbrio

hormonal, contribuindo para cânceres dependentes de estrogênio e impactando a fertilidade. Dessa forma, a análise dessas vias torna-se essencial para a avaliação de riscos químicos associados a disfunções hormonais e inflamatórias (Banerjee *et al.*, 2018).

Além desses mecanismos, a 7HF apresentou possível ativação da enzima ATAD5, envolvida na regulação do ciclo celular e na manutenção da homeostase genômica (Kim *et al.*, 2020). O ATAD5 atua no controle da replicação do DNA, modulando a quantidade de PCNA nas fábricas de replicação e auxiliando na desmontagem dessas estruturas ao término da síntese. Esse processo garante a eficiência da duplicação do DNA e evita o acúmulo de proteínas replicativas. Quando essa regulação é comprometida, podem ocorrer falhas na replicação, resultando em danos celulares que amplificam a inflamação. Tal ciclo de reparo ineficaz está associado à progressão de condições crônicas, como certos cânceres e doenças autoimunes, revelando a importância do ATAD5 para a estabilidade genômica e a resposta imunológica (Lee *et al.*, 2013; Giovannini *et al.*, 2020).

Além da ativação das enzimas já citadas, houve ativação da TTR, GABAR e AChE. A ativação de TTR, GABAR e AChE desempenha papéis centrais em vários processos biológicos e está intimamente ligada a condições inflamatórias e neurodegenerativas. A ativação da transtirretina (TTR) tem sido associada a processos inflamatórios, especialmente devido ao seu envolvimento na regulação de funções endócrinas e na modulação da resposta imunológica. Em situações inflamatórias, a TTR pode alterar a estabilidade hormonal e afetar o transporte de substâncias vitais, como o retinol e os hormônios tireoidianos (Bezerra *et al.*, 2018 Silva *et al.*, 2019).

Os receptores GABA-A são essenciais para controlar a excitabilidade do sistema nervoso central, equilibrando a atividade neuronal. Sua ativação regula processos que envolvem memória e comportamento, sendo uma forma de controle da inflamação no cérebro. Em doenças inflamatórias e neurodegenerativas, como a esclerose múltipla e a doença de Alzheimer, a modulação desses receptores pode ajudar a reduzir os sintomas e a inflamação cerebral, proporcionando alívio dos distúrbios cognitivos e motores (Forstera *et al.*, 2016). Dessa forma, os dados obtidos ressaltam que a ativação de diferentes alvos moleculares pela 7HF pode estar

simultaneamente ligada a potenciais benefícios e riscos, reforçando a necessidade de análises complementares em modelos experimentais.



Figura 10. Heatmap evidenciando o possível efeito da 7HF sobre enzimas, receptores e vias relacionadas a toxicidade. AhR: Receptor de hidrocarboneto arílico. AR: Receptor de andrógeno. ARLBD: Domínio de ligação do ligante do receptor de andrógeno. ER: Receptor de estrogênio alfa. ER-LBD: Domínio de ligação do ligante do receptor de estrogênio. PPAR-Gamma: Receptor Gamma Ativado por Proliferador de Peroxissomo. nrf2/ARE: Fator nuclear (derivado de eritróide 2)-como 2/elemento responsivo a antioxidantes. HSE: Elemento de resposta do fator de choque térmico. MMP: Potencial de membrana mitocondrial p53: Fosfoproteína. ATAD5: Família ATPase domínio AAA contendo proteína 5. THR α : Receptor de hormônio tireoidiano alfa. THR β : Receptor beta do hormônio tireoidiano. TTR: Transtiretrina. RYR: Receptor de rianodina. GABAR: Receptor GABA. NMDAR: Receptor de glutamato Nmetil-D-aspartato. AMPAR: receptor alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato. KAR: Receptor de kainato. AChE: Acetilcolinesterase

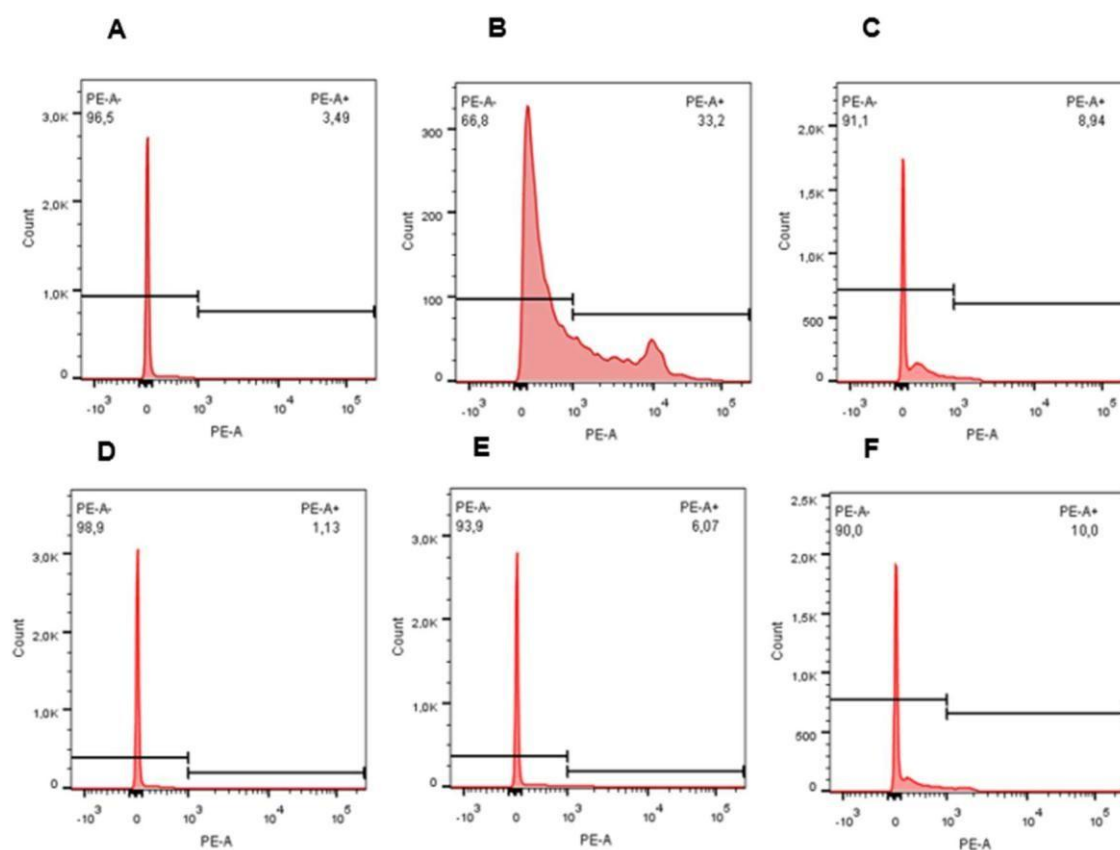
Fonte: Autoria própria, 2025.

6.2 Avaliação da citotoxicidade da 7-hidroxi flavona em esplenócitos murinos

A avaliação da citotoxicidade da 7-hidroxi flavona (7HF) em esplenócitos de camundongos BALB/c, utilizando a marcação com iodeto de propídio (PI), evidenciou que a molécula não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas (10, 20 e

40 μM). Vale destacar que, como controle positivo, a violeta de genciana a 10 μM reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade em cerca de 70% (**Figura 11**).

A ausência de citotoxicidade da 7HF em esplenócitos murinos está em consonância com achados anteriores sobre flavonas, que apresentam efeitos antiproliferativos ou moduladores celulares sem induzir citotoxicidade em até 50 μM . Por exemplo, estudos prévios demonstraram que flavonoides, como a daidzeína e a diosmetina, não prejudicam a viabilidade de esplenócitos murinos (López-Posadas *et al.* 2008). Esses achados indicam que a 7-hidroxi flavona (7HF) pode apresentar um perfil de ação caracterizado pela inibição da proliferação celular sem induzir citotoxicidade significativa, o que reforça seu potencial como candidato farmacológico.



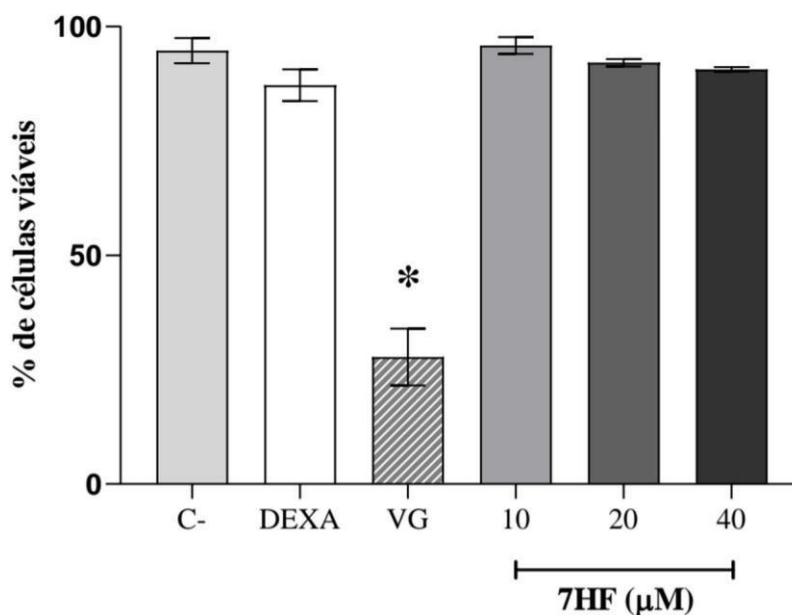


Figura 11. Efeito citotóxico da 7HF em esplenócitos de camundongos BALB/c. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram cultivados na ausência (A) ou presença de 7-hidroxi-flavona (7HF), violeta de genciana (VG; B) ou dexametasona (Dexa; C), em diferentes concentrações (10, 20 e 40 μM ; D, E, F) após 72 horas de tratamento. A avaliação da atividade citotóxica foi feita a partir da marcação com iodeto de propídio, após aquisição e análise em citômetro de fluxo. Os valores representam a média \pm D.P. de três replicatas de um experimento de três realizados. * $p < 0,05$ versus "-".

6.3 A 7-hidroxi-flavona inibe a linfoproliferação em esplenócitos ativado com Concanavalina A

Uma vez determinada a faixa de concentrações não citotóxicas da 7HF, o seu efeito antiproliferativo foi determinado. Tratamentos com 7HF (10, 20 e 40 μM) sobre esplenócitos ativados por Con A (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultaram em inibição significativa ($p < 0,05$) da proliferação: aproximadamente 10%, 24% e 58%, nas concentrações de 10, 20 e 40 μM respectivamente, em comparação com o controle estimulado. A dexametasona (10 μM), utilizada como controle positivo, promoveu uma inibição mais acentuada da proliferação ($\approx 81\%$), o que é compatível com seu conhecido efeito imunossupressor mediado pela ativação do receptor de glicocorticoides e consequente repressão de genes envolvidos na ativação e expansão linfocitária (Batuman et al., 1994). Esses dados permitem contextualizar a magnitude do efeito da 7HF em relação a um fármaco de referência amplamente utilizado. (Figura 12).

A luteolina e a apigenina, flavonas naturalmente presentes em diversas plantas, inibem *in vitro* proliferação induzida por antígenos específicos e a produção de interferon-gama (IFN- γ) por células T autoimunes murinas e humanas (Verbeek *et al.*, 2004). Esses dados são compatíveis com os efeitos observados da 7HF sobre a expansão clonal de esplenócitos, indicando que as flavonas possuem um potencial imunomodulador relevante para suprimir respostas autoimunes mediadas por células T. A resposta similar em modelos murinos e humanos reforça a utilidade dos modelos experimentais para o estudo do impacto imunológico dessas moléculas.

Além dos efeitos observados para a 7-hidroxi-flavona (7HF), o flavonoide vitexicarpina (também conhecido como casticina), isolado dos frutos de *Vitex rotundifolia*, tem sido amplamente estudado por suas propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras. O estudo pioneiro de You *et al.*, (1998) demonstrou que a vitexicarpina inibe de forma pronunciada a proliferação de linfócitos murinos, tanto de células T quanto de células B, apresentando um valor de IC₅₀ em faixa submicromolar (aproximadamente 0,7 μ M). Além disso, o composto suprimiu o crescimento de diferentes linhagens tumorais, com valores de IC₅₀ entre 0,25 e 0,3 μ M, evidenciando uma potente ação antiproliferativa.

Pesquisas mais recentes corroboram e ampliam esses achados, como no estudo de Lee *et al.*, 2013 demonstrando que a vitexicarpina atua como um potente agente anti-inflamatório ao inibir a ativação de macrófagos induzida por lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro*, reduzindo significativamente a produção de mediadores pró-inflamatórios, como o óxido nítrico (NO). Nesses ensaios, a vitexicarpina mostrou eficácia em um amplo intervalo de concentrações (0,156–50 μ g/mL) na inibição da liberação de NO. Em modelos *in vivo* de inflamação aguda, o tratamento também resultou em redução significativa do edema e da infiltração de células inflamatórias.

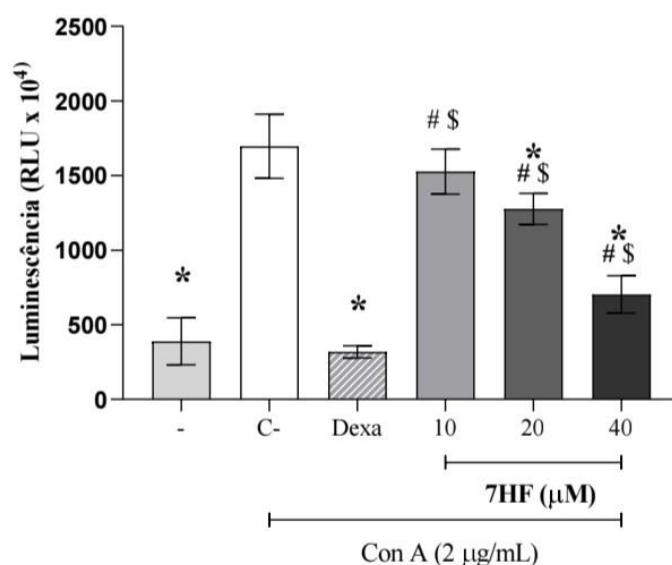


Figura 12. A 7-hidroxi flavona inibe a linfoproliferação de esplenócitos ativadas com concanavalina A. A linfoproliferação foi avaliada com a utilização do reagente CellTiter Glo® em culturas de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados ou não com Con A (2 µg/mL) e tratados ou não com a 7-hidroxi flavona (7HF) (10, 20 e 40 µM) ou dexametasona (10 µM) durante 72 h. Os valores representam as médias ± S.D. de seis determinações obtidas em um de três experimentos realizados. * $p < 0,05$ em comparação com células estimuladas e não tratadas (C-), # $p > 0,05$ versus Dexa, \$ $p > 0,05$ versus não tratadas nem estimuladas (-).

6.4 A 7-hidroxi flavona reduz a produção de mediadores inflamatórios

O efeito imunossupressor da 7-hidroxi flavona (7HF) foi avaliado quanto à produção de IL-2 e IFN- γ . Após 24 horas de tratamento, observou-se que a 7HF reduziu significativamente os níveis de IL-2 em esplenócitos de camundongos BALB/c, em todas as concentrações testadas (10, 20 e 40 µM), quando comparada ao controle estimulado com concanavalina A e não tratado. As reduções de IL-2 foram de aproximadamente 15%, 56% e 84%, respectivamente ($p < 0,05$). A dexametasona (10 µM) também diminuiu de forma significativa a produção de IL-2, com inibição de cerca de 62% ($p < 0,05$) (**Figura 13**).

De forma concomitante, a 7HF reduziu os níveis de IFN- γ produzidos pelos esplenócitos ativados com Con A, novamente em todas as concentrações avaliadas (10, 20 e 40 µM), resultando em diminuições estatisticamente significativas de 39%, 51% e 61% ($p < 0,05$). (**Figura 13**).

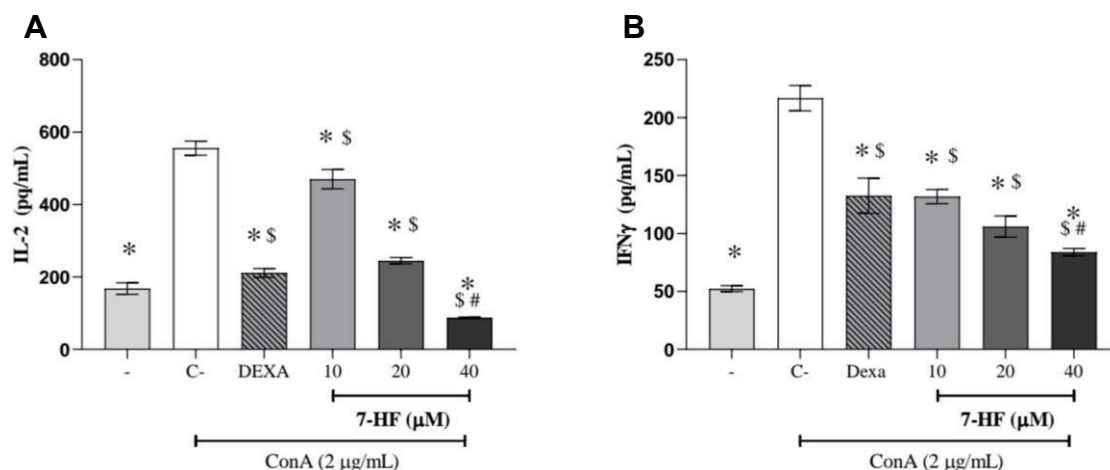


Figura 13. A 7-Hidroxi flavona (7HF) reduz a produção de IL-2 e IFN- γ em linfócitos ativado com concanavalina A. As concentrações de IL-2 (A) e IFN- γ (B) foram determinadas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com Con A (2 μ g/mL) e tratados ou não com a 7HF (40, 20 e 10 μ M) ou dexametasona (10 μ M) durante 24hrs. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e a quantificação das citocinas foi realizada por ELISA. Os valores representam as médias \pm S.D. de seis determinações obtidas em um de três experimentos realizados. * $p < 0,05$ em comparação com células estimuladas e não tratadas (C-), # $p > 0,05$ versus DEXA, \$ $p > 0,05$ versus não tratadas nem estimuladas (-).

Além da redução da linfoproliferação, a 7HF diminuiu significativamente a produção de IL-2 e IFN- γ em esplenócitos ativado, sugerindo modulação tanto da proliferação quanto da função efetora das células T. A IL-2 é essencial para a manutenção de linfócitos T e NK, atuando como fator de crescimento autócrino e parácrino e contribuindo para a regulação de células T regulatórias (Tregs) (Demoiseaux, 2020; Owor *et al.*, 2020). O IFN- γ , por sua vez, é central na polarização Th1, estimulando a proliferação e citotoxicidade de células T efetoras, modulando citocinas como IL-12 e IL-23 e influenciando a homeostase imunológica. Reduções desses mediadores, como observadas com 7HF, refletem um efeito imunossupressor que pode ser relevante no contexto de doenças autoimunes e inflamatórias (Jiang *al.*, 202; Song *et al.*, 2023).

6.5 Avaliação do efeito da 7-Hidroxi flavona sobre as hemácias

O efeito hemolítico da 7-hidroxi flavona (7HF) foi avaliado em culturas de PBMC. Após 1 hora de tratamento, nenhuma das concentrações testadas (10, 20 e 40 μ M) induziu hemólise, indicando ausência de efeito hemolítico sob as condições experimentais avaliadas (**Figura 14**).

A 7HF não causou hemólise em hemácias humanas, sugerindo que sua atividade antiproliferativa pode ocorrer sem comprometer a integridade das membranas celulares. Esse resultado é relevante, pois alguns compostos naturais com efeitos citostáticos podem causar lise de hemácias, limitando seu potencial terapêutico, como observado em extratos hidroalcoólicos de *Himatanthus drasticus* (Figueredo *et al.*, 2017). A ausência de hemólise sugere que a 7HF possui seletividade celular e um perfil de segurança compatível com futuras aplicações farmacológicas, tornando-a um candidato promissor para estudos pré clínicos em imunomodulação e terapias adjuvantes.

6.6 Avaliação da citotoxicidade da 7-Hidroxi flavona em linfócitos humanos

A avaliação da citotoxicidade da 7HF em PBMC humanas, utilizando iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo, demonstrou que a molécula apresenta baixa toxicidade celular nas concentrações testadas (10, 20 e 40 μM) após 72 horas de tratamento, com menos de 10% de células positivas para PI. Como esperado, o controle positivo (VG) induziu citotoxicidade significativa, confirmando a sensibilidade do ensaio. A dexametasona, usada como controle farmacológico, também apresentou baixa toxicidade celular na concentração de 10 μM (**Figura 15**).

Os resultados demonstraram que a 7-hidroxi flavona não reduziu a viabilidade basal de PBMC, sugerindo ausência de citotoxicidade direta sobre essas células. Esse perfil é consistente com estudos prévios que investigaram outros flavonoides, nos quais características estruturais específicas parecem contribuir para a seletividade biológica. Orlikova *et al.* (2014) relataram que flavonoides contendo o grupo metilenodióxi exibiram atividade antitumoral em células de leucemia, sem induzir citotoxicidade em PBMC humanos, o que foi associado à modulação de vias de sinalização envolvidas na proliferação celular, preservando células imunocompetentes. De forma semelhante, Sawadogo *et al.* (2015) demonstraram que a 5-hidroxil-6,7,3',4',5'-pentametoxiflavona, cuja estrutura apresenta extensas substituições oxigenadas no anel flavonoídico, suprimiu a proliferação e induziu apoptose em células tumorais, mantendo a viabilidade de PBMC. Assim, a ausência de toxicidade para células mononucleares humanas observada no presente estudo com a 7HF corrobora o perfil relatado para outras flavonas, reforçando o potencial

desses compostos como candidatos terapêuticos seletivos, capazes de atuar contra células-alvo sem comprometer a integridade de células normais.

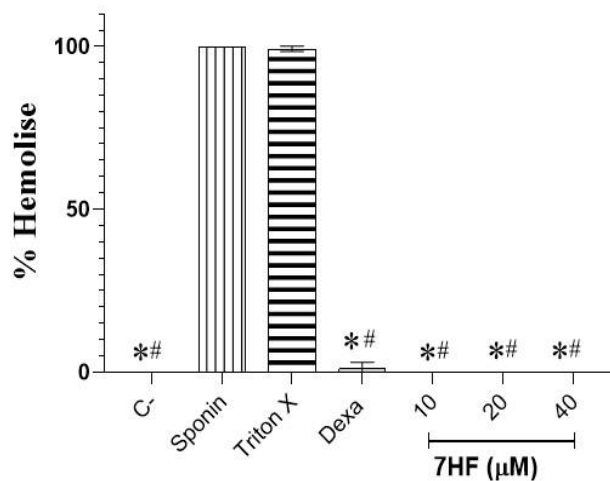
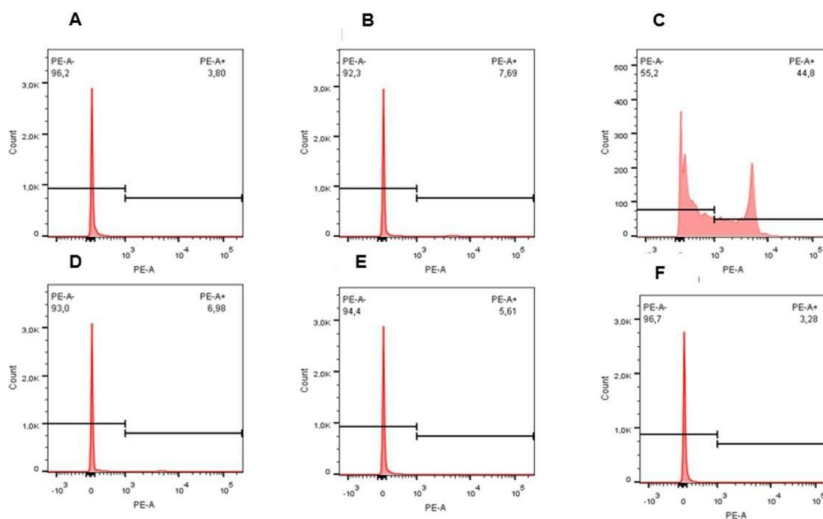


Figura 14. A 7HF não causa hemólise em PBMC humano. O ensaio de hemólise foi realizado em PBMC submetido ao tratamento com a 7HF diferentes concentrações (10, 20 e 40 μM) por 1 hora. A avaliação foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm. Valores representam a média \pm D.P. de quatro replicatas obtidas em um de quatro experimentos realizados. * $p < 0,05$ saponina, # $p < 0,05$ Triton-X.



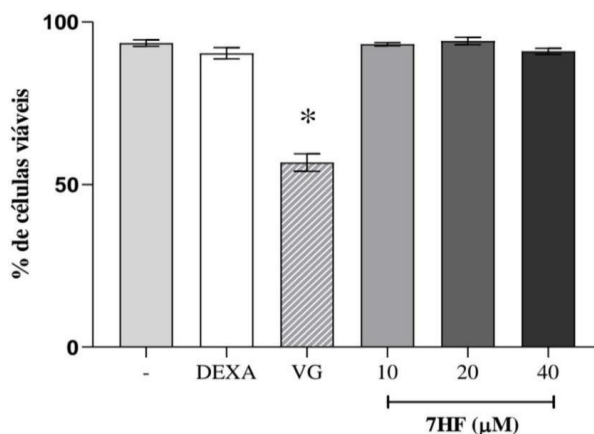


Figura 15. Efeito citotóxico da 7HF em linfócitos humanos. PBMC de pacientes saudáveis foram cultivados na ausência (A) ou presença de 7-hidroxi flavona (7HF), dexametasona (Dexa; B) ou violeta de genciana (VG; C), em diferentes concentrações (10, 20 e 40 μM ; D, E, F) após 72 horas de tratamento. A avaliação da atividade citotóxica foi feita a partir da marcação para iodeto de propídio, após aquisição e análise em citômetro de fluxo. Valores representam a média \pm D.P. de quatro replicatas obtidas em um de três experimentos realizados. * $p < 0,05$ versus "-".

6. 7 A 7HF inibe a linfoproliferação em linfócitos humanos ativados com PHA

O efeito da 7HF sobre a linfoproliferação de PBMC (PHA, 2,5 $\mu\text{g/mL}$) foi avaliado utilizando o reagente CellTiter-Glo[®]. Após 72 horas de incubação, todas as concentrações testadas de 7HF (10, 20 e 40 μM) reduziram significativamente a linfoproliferação em comparação ao controle estimulado e não tratado (C-, $p < 0,05$). A menor concentração (10 μM) promoveu uma inibição de aproximadamente 16%, enquanto a concentração intermediária (20 μM) reduziu cerca de 34%. A maior concentração (40 μM) apresentou o efeito mais pronunciado, com redução de 78%, superando inclusive a inibição observada no grupo tratado com dexametasona (10 μM), utilizado como controle positivo (Figura 16 -A).

Considerando o perfil observado, investigou-se se o efeito da 7HF poderia estar associado à via do receptor de glicocorticoide (GR). Para isso, as PBMC foram tratados na presença ou ausência do antagonista RU-486 (10 μM). A 7HF (40 μM) reduziu significativamente a linfoproliferação em aproximadamente 67% em relação ao controle estimulado e não tratado (C-, $p < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento com RU486 atenuou parcialmente esse efeito, resultando em apenas 36% de inibição, sugerindo que a atividade antiproliferativa da 7HF depende, ao menos em parte, da

ativação da via do receptor de glicocorticoide. De forma semelhante, a dexametasona (10 μM) também inibiu a proliferação linfocitária (~60%), e seu efeito foi revertido, de forma significativa ($p < 0,05$) na presença de RU486, confirmando a participação dessa via (**Figura 16-B**).

Os resultados deste estudo demonstram que a 7-hidroxiavona (7HF) exerce um efeito antiproliferativo dependente da concentração sobre PBMC humanas estimuladas com PHA. Concentrações mais altas (40 μM) da 7HF apresentaram inibição da proliferação superior à da dexametasona, evidenciando seu potente efeito imunossupressor. Esses achados são consistentes com estudos prévios envolvendo flavonoides em PBMC humanas, nos quais quercetina e luteolina reduziram significativamente a proliferação de PBMC de pacientes com esclerose múltipla de forma concentração-dependente, modulando também citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (Jin *et al.*, 2017; Zhen *et al.*, 2017). De forma semelhante, flavonoides isolados de *Boerhaavia diffusa* inibiram a proliferação de PBMC estimuladas com PHA e suprimiram IL-2 e TNF- α , sugerindo que a inibição da proliferação linfocitária é um efeito recorrente de flavonoides imunomoduladores (Pandey *et al.*, 2005).

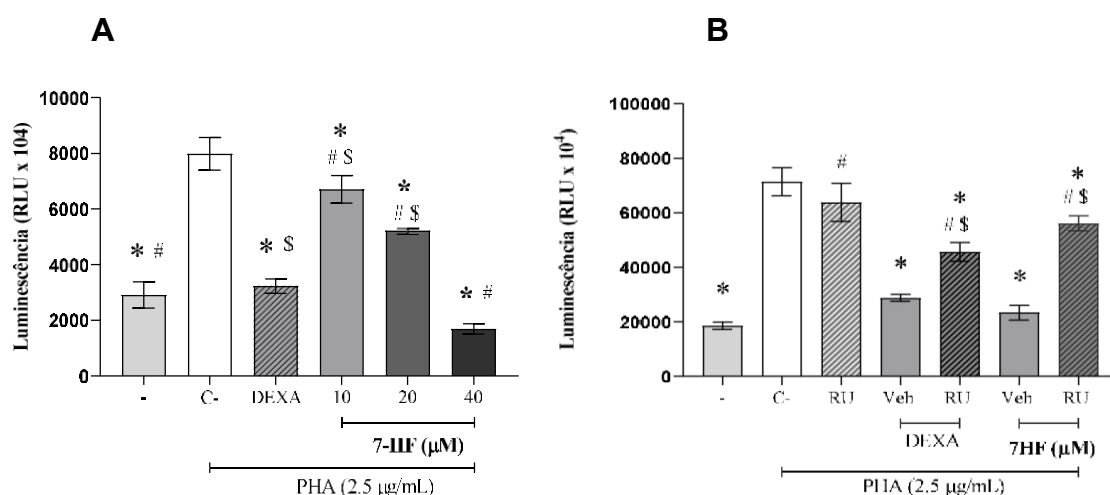


Figura 16. A 7HF inibe a linfoproliferação de linfócitos ativados com PHA. (A) Linfoproliferação de linfócitos humanos avaliada pelo ensaio CellTiter-Glo® após 72 h de cultura, na presença ou ausência do mitógeno PHA (2,5 $\mu\text{g/mL}$). As células foram tratadas ou não com 7HF (10, 20 e 40 μM) ou dexametasona (Dexa; 10 μM). (B) A reversão do efeito da 7HF foi analisada na presença do antagonista do receptor de glicocorticoides (RU-486). Os valores representam médias \pm D.P. ($n = 6$) de um

experimento representativo de três independentes. *p < 0,05 vs. células estimuladas e não tratadas (C-); #p > 0,05 vs. Dexa; \$p > 0,05 vs. células não estimuladas e não tratadas (-).

Além da 7HF, outros compostos fenólicos, como os derivados de *Himatanthus drasticus*, também apresentaram atividade antiproliferativa em células humanas, reforçando o potencial dessa classe de moléculas no controle da resposta imune (Silva *et al.*, 2019). Estudos com silimarina demonstraram efeitos semelhantes, com redução significativa da proliferação e da sobrevivência de células T humanas, evidenciando que flavonoides e derivados fenólicos podem modular múltiplas vias de sinalização responsáveis pela expansão linfocitária (Gharagozloo *et al.*, 2010). Da mesma forma, derivados de chalcona, como reportado por Henmi *et al.* (2009), apresentaram capacidade de bloquear o ciclo celular e induzir apoptose em células humanas, sugerindo que mecanismos de interrupção do ciclo celular e indução de morte programada contribuem para o efeito antiproliferativo observado.

A análise da atividade antiproliferativa da 7-hidroxi-flavona (7HF) em PBMC humanas estimuladas com PHA revelou que a inibição da proliferação linfocitária é parcialmente mediada pelo receptor de glicocorticoide (GR). Na presença do antagonista RU486, a inibição da proliferação caiu de 67% para 36%, indicando que a via do GR contribui significativamente para o efeito da 7HF. Esse mecanismo é relevante, pois flavonoides como quercetina e luteolina também modulam fatores de transcrição, incluindo NF- κ B e AP-1, possivelmente interagindo com a sinalização do GR para reforçar efeitos imunossupressores (Nishizaki *et al.*, 2009).

A participação da via do GR sugere que a 7HF pode atuar sobre linfócitos ativados, minimizando efeitos sobre células em estado basal e reduzindo riscos de imunossupressão sistêmica excessiva. Estudos anteriores demonstraram que flavonoides podem modular a expressão de citocinas inflamatórias e a atividade de células T reguladoras, indicando um potencial terapêutico na modulação da resposta imune (Hosseinzade *et al.*, 2019).

Enquanto alguns flavonoides, como a quercetina, podem proteger PBMC contra o estresse oxidativo e até estimular a proliferação em condições de imunossenescência, a 7-hidroxi-flavona atuou predominantemente como supressora da proliferação linfocitária em PBMC humanas estimuladas com PHA. Esse efeito,

dependente da concentração, pode estar relacionado às características estruturais da 7HF, em especial ao padrão simplificado de hidroxilação, restrito à posição 7 do anel A, o que pode influenciar sua interação com alvos moleculares envolvidos na sinalização linfocitária, como o receptor de glicocorticoides. Em contraste, flavonoides mais polihidroxilados, como a quercetina, apresentam maior capacidade antioxidante e efeitos citoprotetores, associados à presença de múltiplos grupos hidroxila nos anéis A e B. Assim, a modulação parcial da via do GR pela 7HF reforça um perfil imunossupressor consistente, com ação diferenciada sobre linfócitos ativados (Jin et al., 2017).

Evidências adicionais da literatura corroboram essa interpretação, mostrando que múltiplos flavonoides e derivados fenólicos podem induzir efeitos antiproliferativos consistentes, mantendo relativa seletividade e reduzindo efeitos tóxicos em células não ativadas. Estudos sobre flavonoides como apigenina, quercetina e epigallocatequina-3galato (EGCG) destacam-se por suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, sugerindo um potencial terapêutico na modulação da resposta imune (Ginwala *et al.*, 2019).

Assim, a 7HF demonstra um perfil imunossupressor robusto e seletivo, apoiado por mecanismos parciais via GR, reforçando seu potencial como agente modulador da resposta linfocitária sem comprometer células em estado basal.

6.8 A 7-hidroxi flavona reduz a produção de mediadores inflamatórios em linfócitos humanos

O efeito imunomodulador da 7HF também foi avaliado sobre a produção de IL-2 e IFN- γ . Após 24 horas de tratamento, a 7HF promoveu uma redução significativa dos níveis de IL-2 produzidos por linfócitos humanos em todas as concentrações testadas (10, 20 e 40 μ M), quando comparado com o controle apenas estimulado com PHA (2,5 μ g/mL) e não tratado. A 7-hidroxi flavona (7HF) promoveu uma redução estatisticamente significativa na produção de IL-2 nas concentrações de 10, 20 e 40 μ M, correspondendo a diminuições de 15%, 27% e 44%, respectivamente. A dexametasona (10 μ M) também reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a produção de IL-2 (**Figura 17-A**), apresentando uma inibição de 53%. Além da IL-2, também foi quantificada a produção de IFN- γ (**Figura 17-B**), cuja liberação foi reduzida pela 7-

hidroxiflavona (7HF) em todas as concentrações testadas, 10, 20 e 40 μM , com diminuições de 23%, 50% e 73%, respectivamente.

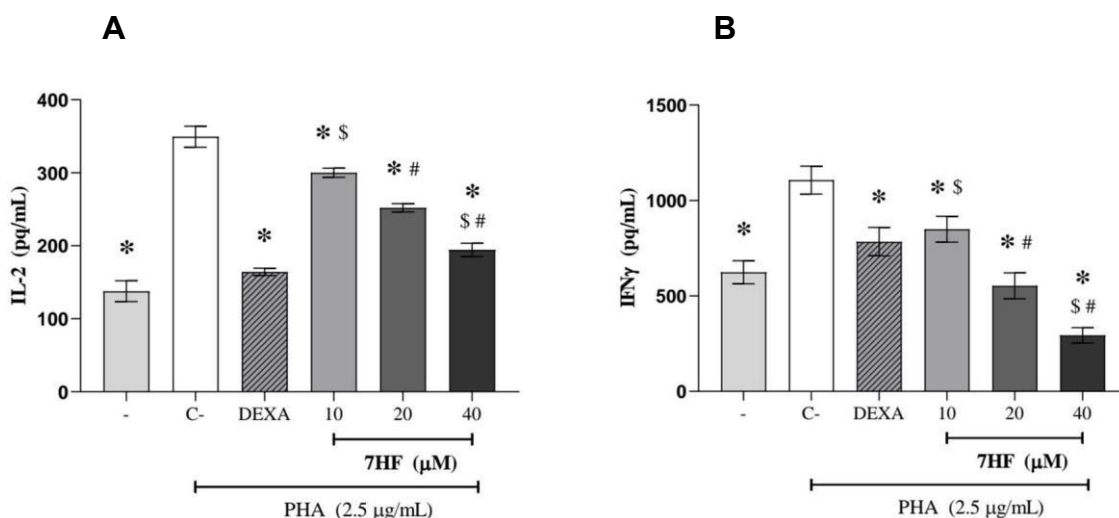


Figura 17. A 7-Hidroxiflavona reduz a produção de IL-2 e IFN- γ em linfócitos ativadas com PHA. As concentrações de IL-2 (A) e IFN- γ (B) foram determinadas em sobrenadantes de cultura de PBMC estimuladas com PHA (2,5 $\mu\text{g/mL}$) e tratados ou não com a 7HF (10, 20 e 40 μM) ou dexametasona (Dexa; 10 μM) durante 24hrs. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e a quantificação das citocinas foi realizada por ELISA. Os valores representam as médias \pm D.P. de seis determinações obtidas em um de três experimentos realizados. * $p < 0,05$ vs. células estimuladas e não tratadas (C-); # $p > 0,05$ vs. Dexa; \$ $p > 0,05$ vs. células não estimuladas e não tratadas (-).

A redução de IL-2 e IFN- γ observada após o tratamento com 7HF confirma o papel deste flavonoide como um modulador negativo da resposta Th1, padrão que já foi descrito para outros compostos fenólicos da mesma classe. Os resultados desse estudo demonstram que a 7HF reduziu a produção de IL-2 de maneira concentração-dependente (15–44%) e inibiu fortemente a secreção de IFN- γ (23–73%). Esses efeitos se assemelham aos da dexametasona, embora de forma mais seletiva, o que sugere a participação da via do receptor de glicocorticoide (GR) e de mecanismos de inibição de fatores de transcrição como NF- κB e AP-1.

Patil *et al.*, (2016) demonstraram que a apigenina inibiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de fatores AP-1 em células A549 estimuladas por PMA, evidenciando que flavonas podem interferir diretamente na maquinaria transcricional responsável pela ativação de genes inflamatórios. Essa observação é

coerente com a capacidade da 7HF de modular tanto IL-2 quanto IFN- γ , citocinas reguladas por AP-1 e NFAT em linfócitos ativados.

De forma semelhante, Kempuraj *et al.* (2005) mostraram que a luteolina inibiu a ativação de mastócitos humanos induzida por proteína básica de mielina, o que levou à redução indireta da ativação de células T Jurkat. Esse achado reforça a hipótese de que flavonas exercem efeitos imunomodulatórios não apenas sobre linfócitos, mas também sobre células acessórias do sistema imune, modulando a rede de interações inflamatórias.

Outros trabalhos também corroboram esse perfil. Martínez *et al.*, (2019) relataram que diferentes flavonas e flavanonas isoladas das folhas de *Dracaena steudneri* inibiram a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células imunes, destacando um padrão conservado entre essas subclasses químicas. Da mesma forma, Mishra *et al.*, (2008) observaram que flavonas do *seabuckthorn* reduziram significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelos *in vitro*, além de apresentarem efeito antioxidante associado.

Essas evidências sustentam que a 7HF compartilha mecanismos com outros flavonoides bem descritos, exercendo atividade imunossupressora por modular fatores transcricionais críticos e reduzir citocinas chave da resposta Th1, como IL-2 e IFN- γ . A diferença está na seletividade: enquanto corticosteróides clássicos induzem imunossupressão sistêmica, a 7HF parece restringir seus efeitos principalmente a linfócitos ativados, o que amplia seu potencial como candidato terapêutico para condições inflamatórias e autoimunes.

6.8 A 7-Hidroxi flavona modula a expressão gênica de genes envolvidos no processo inflamatório

Linfócitos humanos pré-tratados com 7-hidroxi flavona (40 μ M) por 3 horas e posteriormente estimulados com PHA (2,5 μ g/mL) por igual período apresentaram modulação na expressão de genes relacionados ao processo inflamatório, conforme evidenciado pela análise de qRT-PCR (**Figura 18**).

Para os genes envolvidos na ativação e proliferação linfocitária, observa-se que a 7HF provocou redução significativa na expressão das subunidades da

calcineurina (*PPP3CA*, *PPP3CB* e *PPP3CC*) e de *PLCG1*, indicando supressão da sinalização dependente de cálcio e consequente inibição da translocação nuclear dos fatores de transcrição *NFAT1* e *NFAT2*. A diminuição dos níveis de *IL-2*, *IL-2RA* e *IFN- γ* reforça a redução da capacidade proliferativa e secretora dessas células. Notavelmente, as calmodulinas *CALM1* e *CALM3* foram reduzidas, enquanto *CALM2* apresentou aumento compensatório, sugerindo a ativação de mecanismos homeostáticos para manter parcialmente o fluxo de cálcio. Além disso, a modulação de componentes da via *PI3K/AKT* (\uparrow *PIK3CA*, \downarrow *PIK3CB* e \downarrow *AKT2*) indica reprogramação da sinalização prósurvival, contribuindo para o controle da expansão clonal e aumento da susceptibilidade à apoptose. Esses resultados ilustram a atuação integrada da 7HF sobre múltiplos pontos críticos da ativação linfocitária, em consonância com os efeitos descritos na literatura para flavonoides imunomoduladores (Crivici & Ikura, 1995; Kempuraj *et al.*, 2005; SimonMolas *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

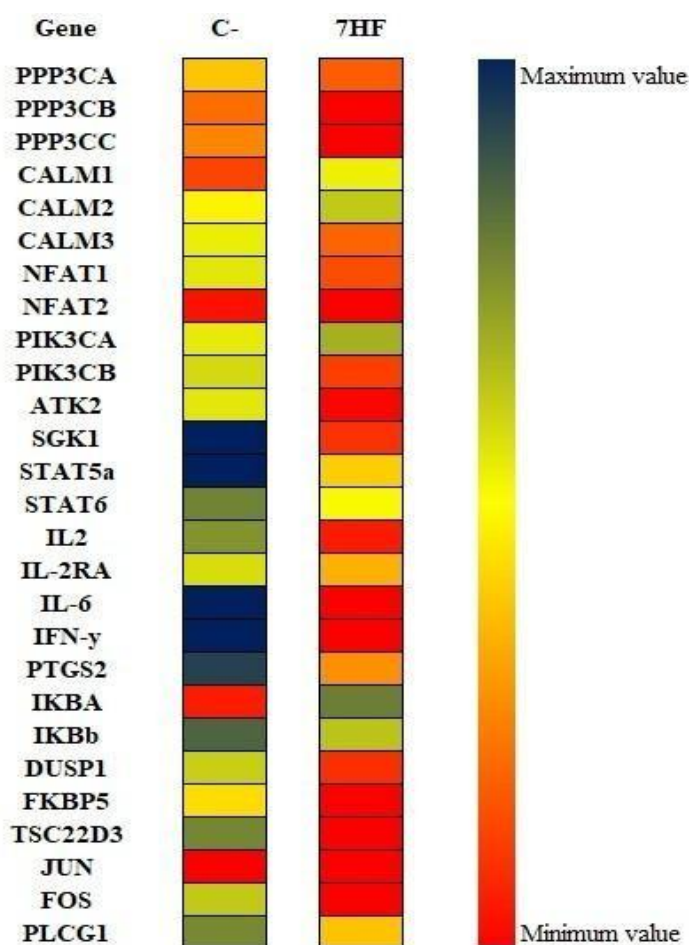


Figura 18. Perfil de expressão gênica em células tratadas com 7-hidroxi flavona (7HF). Heatmap representando a variação relativa da expressão de genes associados às vias de sinalização do NFAT,

NF- κ B e receptores de glicocorticóides em células estimuladas (C-) e tratadas com 7HF. As cores indicam a intensidade de expressão de cada gene, variando do valor mínimo (vermelho) ao máximo (azul), conforme a escala apresentada.

Em relação aos genes regulados pelo receptor de glicocorticóides (GR), incluindo *TSC22D3* (GILZ), *SGK1*, *FKBP5* e *DUSP1*, houve redução da expressão desses genes, indicando que a 7HF atua como modulador seletivo do GR, modulando a retroalimentação negativa clássica sem induzir fortemente os genes típicos ativados pelo receptor. A diminuição de *TSC22D3* sugere interferência na regulação anti-inflamatória via *NF- κ B* e *AP-1*, enquanto a redução de *FKBP5* indica possível manutenção do GR em estado responsivo, evitando retroalimentação negativa excessiva. A modulação de *SGK1* e *DUSP1* evidencia efeitos da 7HF sobre vias interligadas à sinalização inflamatória, incluindo *NF- κ B*, *AP-1* e *PI3K/AKT*, reforçando seu perfil imunomodulador seletivo e seguro (Mittelstadt & Ashwell, 2001; Binder, 2009; Park & Song, 2013; Fries *et al.*, 2017; Almatroodi *et al.*, 2024).

Já sobre os genes de fatores de transcrição *STAT5a* e *STAT6*, componentes essenciais da via *JAK/STAT*, que regula a transdução de sinais pró-inflamatórios mediada por citocinas como *IL-2* e *IL-4*, a 7HF provocou a diminuição da expressão de *STAT5a* e *STAT6* sugere que a 7HF interfere na ativação de sinais que promovem a diferenciação de células T efectoras e a expressão de mediadores inflamatórios. Esses resultados estão em concordância com estudos prévios que demonstraram que flavonoides, como kaempferol e quercetina, suprimem a ativação de *STAT6* em células humanas, reduzindo respostas inflamatórias crônicas e mediadores associados à ativação de vias imunes (Cortes *et al.*, 2007; Irie *et al.*, 2016; Ebihara *et al.*, 2018; Otaki *et al.*, 2023).

Os efeitos da 7HF sobre citocinas e mediadores da apoptose, incluindo *IL-6*, *PTGS2* (*COX-2*) e *CASP-1*, mostraram uma redução de *IL-6*, indicando supressão da ativação persistente de linfócitos é possível atenuação da diferenciação de células T efectoras, enquanto a diminuição de *PTGS2* sugere redução da síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias. A queda na expressão de *CASP-1* evidencia modulação do inflamassoma e da piroptose, contribuindo para a diminuição de respostas inflamatórias e apoptóticas. Esses achados corroboram estudos prévios com flavonoides como baicalina, naringenina e butin, que também mostraram redução

de *IL-6*, *COX-2* e *CASP-1* em células humanas, reforçando o perfil anti-inflamatório multifatorial da 7HF (Saric *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2025).

Os resultados deste estudo demonstram que a 7HF exerce um efeito coordenado e seletivo sobre genes essenciais à ativação, proliferação e regulação de linfócitos T humanos estimulados com PHA. A redução das subunidades da calcineurina (*PPP3CA*, *PPP3CB* e *PPP3CC*) e de *PLCG1* sugere que a 7HF interfere na desfosforilação e ativação dos fatores de transcrição *NFAT1* e *NFAT2*, bloqueando sua translocação nuclear e diminuindo a expressão de *IL-2*, *IL-2RA* e *IFN- γ* (Crivici e Ikura, 1995; Kempuraj *et al.*, 2008). O aumento compensatório de *CALM2*, em contraste com a redução de *CALM1* e *CALM3*, evidencia mecanismos homeostáticos que mantêm parcialmente o fluxo de cálcio, preservando funções celulares essenciais enquanto suprimem a ativação excessiva. Essa regulação seletiva é consistente com os efeitos descritos para outros flavonoides, que modulam a sinalização dependente de cálcio e a ativação de *NFAT* sem comprometer a viabilidade celular.

Na via *PI3K/AKT*, o aumento de *PIK3CA* e a redução de *PIK3CB* e *AKT2* indicam uma reprogramação da sinalização pró-survival, capaz de reduzir a expansão clonal e aumentar a susceptibilidade à apoptose, alinhando-se a efeitos observados para outros flavonoides, como kaempferol (Zughaibi *et al.*, 2021).

A modulação de genes clássicos do receptor de glicocorticoides (GR), incluindo *TSC22D3* (GILZ), *FKBP5*, *DUSP1* e *SGK1*, sugere que a 7HF atua como modulador seletivo do GR, interferindo na retroalimentação negativa e mantendo o receptor em estado responsivo (Mittelstadt e Ashwell, 2001; Park e Song, 2005; Wei *et al.*, 2016; Bereshchenko *et al.*, 2019; Kanda *et al.*, 2020). A redução de *JUN*, *FOS* e *I κ B- β* , com preservação de *I κ B- α* (**Figura 18**), indica trans-repressão seletiva de fatores pró-inflamatórios sem comprometer a viabilidade celular, reforçando a ação típica de flavonoides imunomoduladores (Cai *et al.*, 2013; Gutiérrez-Venegas *et al.*, 2017; Mohammadpour *et al.*, 2018).

A diminuição de *STAT5a* e *STAT6* complementa o perfil anti-inflamatório da 7HF, modulando sinais pró-inflamatórios mediados por *IL-2* e *IL-4*, afetando a diferenciação de células T efectoras e a expressão de mediadores inflamatórios, de

forma consistente com efeitos relatados para kaempferol e quercetina (Cortes *et al.*, 2007; Irie *et al.*, 2016; Ebihara *et al.*, 2018; Otaki *et al.*, 2023).

Além disso, a 7HF reduziu a expressão de *IL-6*, *PTGS2* (*COX-2*) e *CASP-1*, evidenciando efeito convergente sobre citocinas pró-inflamatórias e mediadores de apoptose. A redução de *IL-6* indica atenuação da ativação persistente de linfócitos; a queda de *PTGS2* aponta para supressão da síntese de prostaglandinas; e a diminuição de *CASP-1* sugere modulação do inflamassoma e da piroptose. Tais efeitos corroboram observações feitas com outros flavonoides, incluindo baicalina, naringenina e butina (Saric *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2025).

Em conjunto, os dados mostram que a 7HF atua de forma integrada sobre múltiplos pontos críticos da ativação linfocitária — do fluxo de cálcio, calcineurina e *NFAT*, passando pelo GR, *NF-κB/AP-1* e *STAT*, até citocinas e mediadores de apoptose — promovendo imunomodulação seletiva e segura, consistente com o perfil de flavonoides imunossupressores relatado na literatura (Hosseinzade *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019).

6.9 Ancoragem (Docking Molecular)

A **Figura 19** mostra a ciclosporina A ancorada no sítio de ligação da calcineurina, bem como o RU-486 ancorado no sítio de ligação do receptor glicocorticoide. Como pode ser observado, foram obtidos bons ajustes geométricos entre cada ligante original (co-cristalizado) e suas respectivas poses ancoradas. Além disso, os valores de RMSD correspondentes foram, respectivamente, 0,39 Å e 0,48 Å. Considerando que, para fins de validação da ancoragem (docking molecular), é uma boa prática que os valores de RMSD das poses ancoradas sejam de até 2,00 Å, conclui-se que foi estabelecido um protocolo de docking satisfatório para ambos os sistemas.

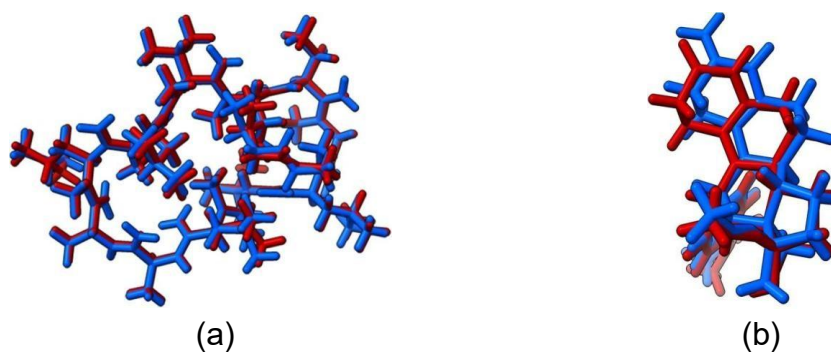


Figura 19. Validação do protocolo de docking Molecular por Redocking de Ligantes de Referência. (a) Ciclosporina A ancorada no sítio de ligação da calcineurina (PDB ID: 1MF8); (b) RU486 ancorada no sítio de ligação do receptor glicocorticoide (PDB ID: 1NHZ). As poses originais cocrystalizadas e as ancoradas são mostradas, respectivamente, em vermelho e azul.

A **Figura 20** mostra a dexametasona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina. Visões detalhadas das interações ligante-proteína são apresentadas nas **Figuras 21a e 21b**. Essa molécula interage com a cadeia C da proteína (Asn102: ligação de hidrogênio e com a cadeia A (Trp362 e Phe356: interação π -alquil; Ser353: interação van der Waals). O respectivo valor de pontuação ChemPLP (docking) é 54,95.

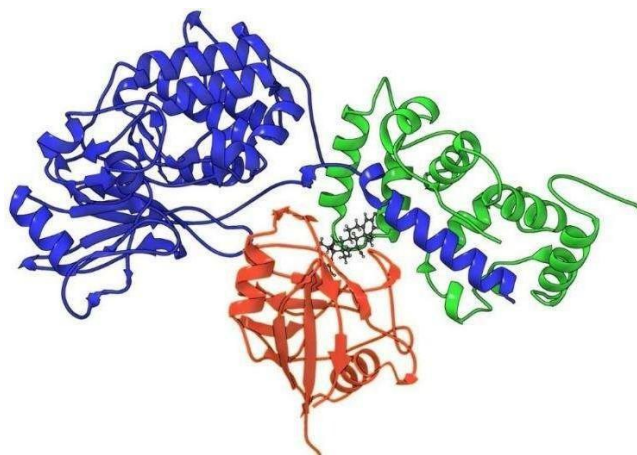


Figura 20. Dexametasona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina. Dexametasona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina (PDB ID: 1MF8). As cadeias A, B e C são mostradas, respectivamente, em azul, verde e laranja.

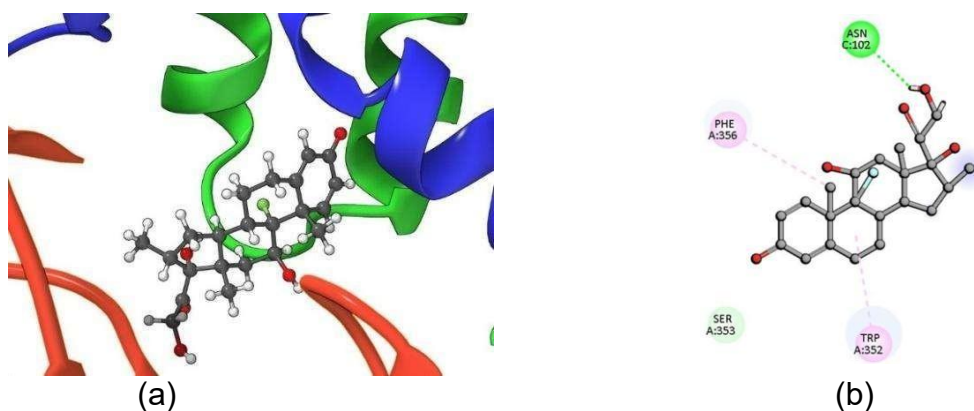


Figura 21. Visão geral da ancoragem da dexametasona à calcineurina. Dexametasona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina (PDB ID: 1MF8). (a) Representação 3D; (b)

Representação 2D: interação por hidrogênio em verde escuro, interações π -alquil em rosa e interação van der Waals em verde claro.

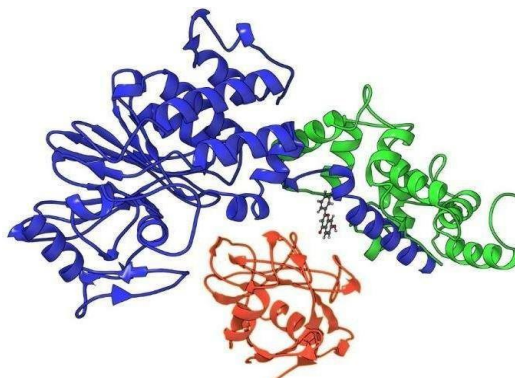


Figura 22. 7-Hidroxiflavona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina. 7-Hidroxiflavona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina (PDB ID: 1MF8). As cadeias A, B e C são mostradas, respectivamente, em azul, verde e laranja.

A **Figura 22** mostra a 7-hidroxiflavona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina (PDB ID: 1MF8). Visões detalhadas das interações ligante-proteína são apresentadas nas **Figuras 23a e 23b**. Essa molécula interage com a cadeia A da proteína (Pro355: interação π -alquil; Trp352 e Phe356: interação π - π empilhada) e com a cadeia B (Met118: interação π -alquil). O valor de pontuação ChemPLP (docking) correspondente é 57,05.

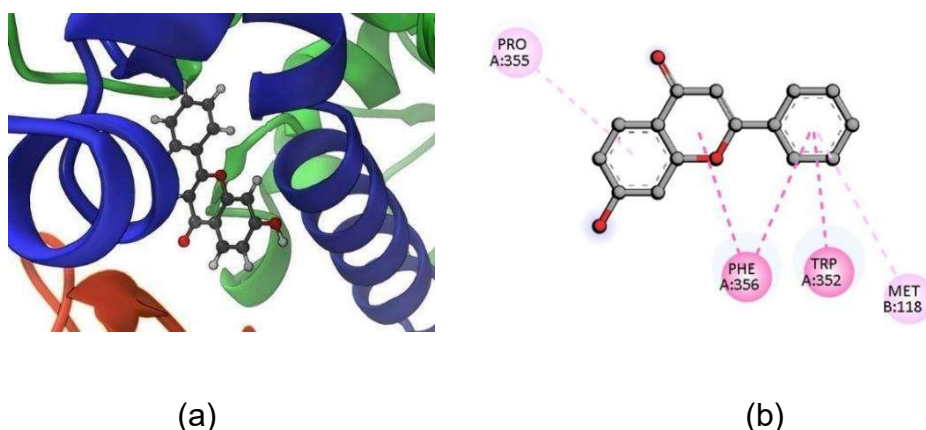


Figura 23. 7-Hidroxiflavona ancorada ao sítio de ligação da calcineurina (PDB ID: 1MF8). (a) Representação 3D; (b) Representação 2D: interações π -alquil e π - π empilhadas são mostradas em rosa claro e rosa escuro, respectivamente.

A **Figura 24** mostra a dexametasona ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide (PDB ID: 1NHZ). Visões detalhadas das interações ligante-proteína são apresentadas nas **Figura 25a e 25b**. Este receptor envolve apenas uma cadeia

(A), mostrada em verde (Arg611, Gin642 e Cys736: interação por hidrogênio; Met646, Leu732 e Tyr735: interação alquil-alquil; e Met604: colisão desfavorável).

Além disso, com base na literatura (Kauppi *et al.*, 2003), uma das seis moléculas de água (HOH126), que formam uma rede intrínseca de interações de hidrogênio no sítio de ligação, interage com o ligante co-cristalizado (RU-486), e portanto, foi mantida no sistema. O valor de pontuação ChemPLP (docking) correspondente é 65,35.

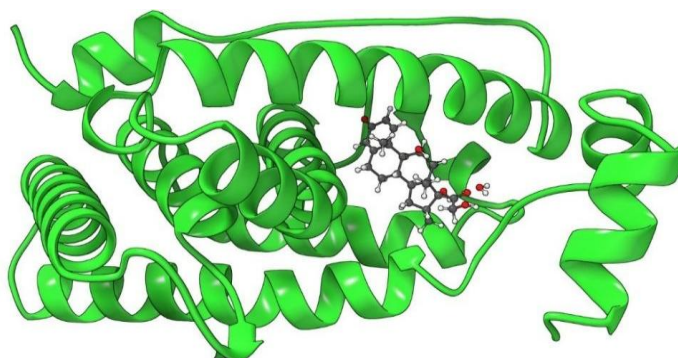


Figura 24. Dexametasona ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide. 7HF ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide (PDB ID: 1NHZ).

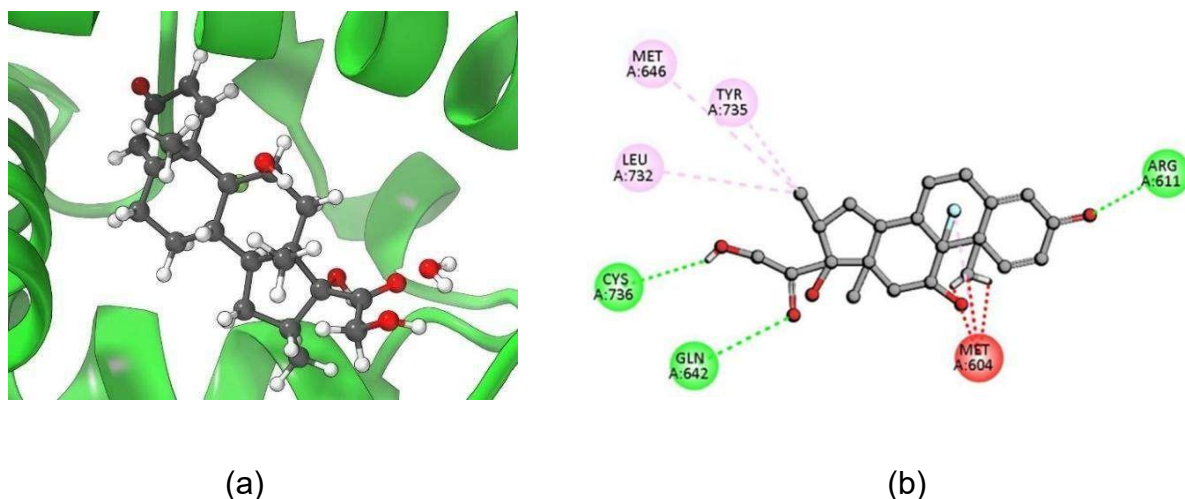


Figura 25. Dexametasona ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide (PDB ID: 1NHZ). (a) Representação 3D; (b) Representação 2D: ligação de hidrogênio em verde, interações π alquil em rosa e colisão desfavorável (unfavorable bump) em vermelho.

A **Figura 26** mostra a 7-hidroxi-flavona ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide (PDB ID: 1NHZ). Visões detalhadas das interações ligante-proteína são apresentadas nas **Figuras 27a e 27b**. As interações obtidas entre o ligante e o receptor foram: Leu563: interações de hidrogênio e π -alquil; Met604 e Leu732:

interação π -alquil; e Met646: interações π -alquil e π -enxofre. O valor de pontuação ChemPLP (docking) correspondente é 49,54.

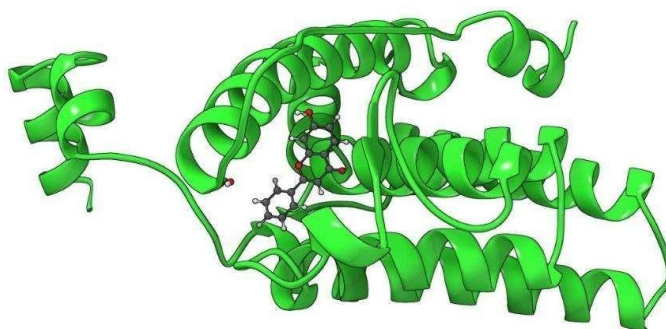


Figura 26. 7HF ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide. 7HF ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide (PDB ID: 1NHZ).

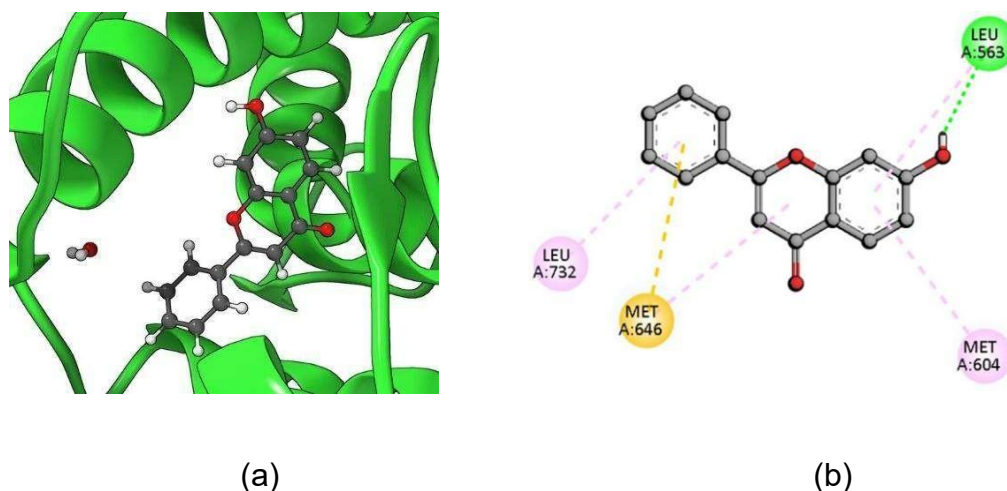


Figura 27. Representações 3D e 2D das Interações da 7-Hidroxi-flavona com o Receptor Glicocorticoide. 7-Hidroxi-flavona ancorada ao sítio de ligação do receptor glicocorticoide (PDB ID: 1NHZ). (a) Representação 3D; (b) Representação 2D: ligação de hidrogênio em verde, interações π -alquil empilhadas em rosa e interação π -enxofre em amarelo.

Com base nos resultados acima, pode-se concluir que, do ponto de vista da modelagem molecular, a 7-hidroxi-flavona pode ser considerada um inibidor potencial para ambos os sistemas proteicos. Devido aos valores de ChemPLP calculados de 54,95 e 57,05, respectivamente, a 7-hidroxi-flavona apresenta maior afinidade de docking com a calcineurina do que a dexametasona.

Já em relação ao receptor glicocorticoide, a 7-hidroxi-flavona apresenta menor afinidade de docking do que a dexametasona (valores de ChemPLP de 49,54 e 65,35, respectivamente). No entanto, como pode ser observado na **Figura 27b**, a dexametasona apresenta um choque estérico desfavorável com o resíduo Met640.

Uma análise mais detalhada mostra que dois grupos metil, um da dexametasona e outro do resíduo de aminoácido, estão muito próximos entre si. Nesse contexto, uma pequena variação conformacional da dexametasona poderia alterar essa situação, fazendo com que ambas as moléculas apresentassem quase o mesmo grau de afinidade de docking para o receptor glicocorticoide.

7. CONCLUSÃO

A 7-hidroxi flavona (7HF) demonstrou um perfil promissor como agente imunomodulador, com boa biodisponibilidade oral, baixa toxicidade predita e ausência de citotoxicidade *in vitro* (**Figura 28**). A molécula inibiu a proliferação de linfócitos ativados, efeito parcialmente dependente do receptor glicocorticoide, e reduziu a produção de IL-2 e IFN- γ , confirmando sua ação supressora sobre a resposta inflamatória. Em nível molecular, a 7HF modulou vias críticas da ativação imune, incluindo calcineurina/NFAT, PI3K/AKT, JAK/STAT e NF- κ B/AP-1, e suprimiu genes inflamatórios como IL-6 e COX-2.

Os dados de docking molecular indicam que a 7HF apresenta afinidade significativa tanto pela calcineurina (ChemPLP = 54,95) quanto pelo receptor glicocorticoide (ChemPLP = 49,54), sugerindo potencial de inibição semelhante à dexametasona nos respectivos alvos. Esses resultados reforçam o potencial da 7HF como candidata promissora para o desenvolvimento de terapias imunomoduladoras em doenças imunomediadas.

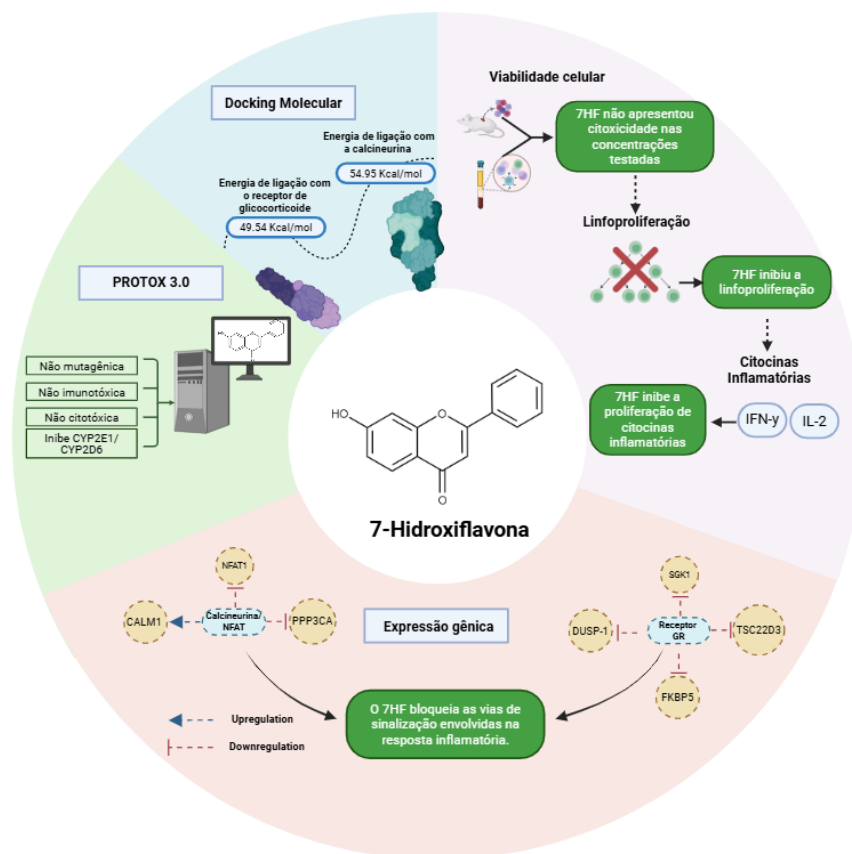


Figura 28. Representação esquemática integrada dos efeitos biológicos, moleculares e computacionais da 7-hidroxi flavona (7HF). A molécula apresentou afinidade de ligação com a

calcineurina e com o receptor de glicocorticoide em análises de *docking* molecular, sugerindo potencial modulação dessas vias. As predições *in silico* de toxicidade (PROTOX 3.0) indicaram um perfil de segurança favorável, sem características mutagênicas, imunotóxicas ou citotóxicas, além de ausência de inibição significativa das enzimas CYP2E1 e CYP2D6. Ensaio celulares demonstraram que a 7HF não apresenta citotoxicidade nas concentrações testadas, porém inibe a linfoproliferação e reduz a produção de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e IL-2. A análise de expressão gênica revelou que a 7HF bloqueia vias de sinalização associadas à resposta inflamatória, incluindo os eixos calcineurina/NFAT, NF- κ B e GR, com modulação de genes reguladores como *PPP3CA*, *FKBP5*, *DUSP1*, *SGK1* e *TSC22D3*. Setas contínuas indicam *upregulation* e setas tracejadas indicam *downregulation*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. [S.d.].

ALMAWI, Wassim Y.; MELEMEDJIAN, Ohannes K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 1, p. 9–15, 1 jan. 2002.

ARNOTT, John A.; PLANEY, Sonia Lobo. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 863–875, out. 2012.

ASSA, Farnaz *et al.* Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 492–509, 19 maio 2017.

ATANASOV, Atanas G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, mar. 2021.

ATHANASSIOU, Panagiotis; ATHANASSIOU, Lambros. Current Treatment Approach, Emerging Therapies and New Horizons in Systemic Lupus Erythematosus. **Life**, v. 13, n. 7, p. 1496, 1 jul. 2023.

BACCHI, S. *et al.* Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review. [S.d.].

BANERJEE, Priyanka *et al.* ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W513–W520, 5 jul. 2024.

BANERJEE, Priyanka *et al.* ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2 jul. 2018.

BARRECA, Maria Magdalena; ALESSANDRO, Riccardo; CORRADO, Chiara. Effects of Flavonoids on Cancer, Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases: Role of NF- κ B Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9236, 25 maio 2023.

BATUMAN, O. A. *et al.* Glucocorticoid-mediated inhibition of interleukin-2 receptor α and β subunit expression by human T cells. **Immunopharmacology**, v. 27, n. 1, p. 43–55, jan. 1994.

BEGINES, Belén *et al.* Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. **Nanomaterials**, v. 10, n. 7, p. 1403, 19 jul. 2020.

BERESHCHENKO, Oxana *et al.* Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper: A Novel Antiinflammatory Molecule. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 308, 27 mar. 2019.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. **The Protein Data Bank**. *Nucleic Acids Research*, v. 28, p. 235–242, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>. Acesso em: 21 out. 2025.

BERRIDGE, Michael J.; LIPP, Peter; BOOTMAN, Martin D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 11–21, out. 2000.

BEZERRA, Lucas Soares *et al.* Impacts of Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) Genetic Polymorphism in Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 40, n. 12, p. 794–799, dez. 2018.

BINDER, Elisabeth B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. S186–S195, dez. 2009.

BIOVIA, Dassault Systèmes 21.1.0. **Discovery Studio Visualizer**. San Diego: Dassault Systèmes, 2021.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo; BOGLIOLO, Luigi. *Bogliolo: patologia - 10. ed.* Rio de Janeiro, RJ: **Guanabara Koogan**, 2022.

BOLIGON, Aline Augusti *et al.* Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 5, p. 358–367, out. 2014.

BONILLA, Francisco A.; OETTGEN, Hans C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S33–S40, fev. 2010.

BRAUN, Barry; NEWMAN, Alissa. Accounting for the Nutritional Context to Correctly Interpret Results from Studies of Exercise and Sedentary Behavior. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2230, 16 set. 2019.

BRESALIER, Robert S. *et al.* Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial. **The New England Journal of Medicine**, 2005.

BUNTE, Kübra; BEIKLER, Thomas. Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3394, 10 jul. 2019.

CAI, Xueting *et al.* Digitoflavone Inhibits I κ B α Kinase and Enhances Apoptosis Induced by TNF α through Downregulation of Expression of Nuclear Factor κ B-Regulated Gene Products in Human Pancreatic Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77126, 11 out. 2013.

- CAI, Xueting *et al.* Digitoflavone Inhibits I κ B α Kinase and Enhances Apoptosis Induced by TNF α through Downregulation of Expression of Nuclear Factor κ B-Regulated Gene Products in Human Pancreatic Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77126, 11 out. 2013.
- CARBALLO-VILLALOBOS, A. I.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 3, p. 396–405, mar. 2014.
- CHAACHOUAY, Nouredine; ZIDANE, Lahcen. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. **Drugs and Drug Candidates**, v. 3, n. 1, p. 184–207, 19 fev. 2024.
- CHAGAS, Maria Do Socorro S. *et al.* Flavonols and Flavones as Potential antiInflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, n. 1, p. 9966750, jan. 2022.
- CHAPLIN, David D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3–S23, fev. 2010.
- CHEN, Chunhui *et al.* Baicalin suppresses IL-1 β -induced expression of inflammatory cytokines via blocking NF- κ B in human osteoarthritis chondrocytes and shows protective effect in mice osteoarthritis models. **International Immunopharmacology**, v. 52, p. 218–226, nov. 2017.
- CHEN, Chunhui *et al.* Baicalin suppresses IL-1 β -induced expression of inflammatory cytokines via blocking NF- κ B in human osteoarthritis chondrocytes and shows protective effect in mice osteoarthritis models. **International Immunopharmacology**, v. 52, p. 218–226, nov. 2017.
- CHEN, Jiarui *et al.* Chemical toxicity prediction based on semi-supervised learning and graph convolutional neural network. **Journal of Cheminformatics**, v. 13, n. 1, p. 93, dez. 2021.
- CHEN, Kuihao; GAO, Zhe. Acacetin, a Natural Flavone with Potential in Improving Liver Disease Based on Its Anti-Inflammation, Anti-Cancer, Anti-Infection and Other Effects. **Molecules**, v. 29, n. 20, p. 4872, 14 out. 2024.
- CHEN, Minjun *et al.* DILIrank: the largest reference drug list ranked by the risk for developing drug-induced liver injury in humans. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 4, p. 648–653, abr. 2016.
- CORTES, Jose R. *et al.* Kaempferol Inhibits IL-4-Induced STAT6 Activation by Specifically Targeting JAK3. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3881–3887, 15 set. 2007.
- CORTES, Jose R. *et al.* Kaempferol Inhibits IL-4-Induced STAT6 Activation by Specifically Targeting JAK3. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3881–3887, 15 set. 2007.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, jun. 2013.

CRIVICI, A. Molecular and Structural Basis of Target Recognition by Calmodulin. [S.d.].

CRIVICI, A. Molecular and Structural Basis of Target Recognition by Calmodulin. [S.d.].

CRIVICI, A.; IKURO, M. Molecular and Structural Basis of Target Recognition by Calmodulin. [S.d.].

CRUVINEL, Wilson De Melo *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

CUTOLO, Maurizio; SOLDANO, Stefano; SMITH, Vanessa. Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 7, p. 753–764, 3 jul. 2019.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42717, 3 mar. 2017.

DAMOISEAUX, Jan. The IL-2 – IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor. **Clinical Immunology**, v. 218, p. 108515, set. 2020.

DAMOISEAUX, Jan. The IL-2 – IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor. **Clinical Immunology**, v. 218, p. 108515, set. 2020.

DE JONG, Joke C. *et al.* Functional Expression of the Human Thiazide-Sensitive NaCl Cotransporter in Madin-Darby Canine Kidney Cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 10, p. 2428–2435, out. 2003.

DE JONG, Laura M. *et al.* Distinct Effects of Inflammation on Cytochrome P450 Regulation and Drug Metabolism: Lessons from Experimental Models and a Potential Role for Pharmacogenetics. **Genes**, v. 11, n. 12, p. 1509, 16 dez. 2020.

DOLABELA, Maria Fâni *et al.* Estudo *in silico* das atividades de triterpenos e iridoides isolados de *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 227, 29 out. 2018.

DOMINGOS, Olívia Da S. *et al.* Anti-Inflammatory Derivatives with Dual Mechanism of Action from the Metabolomic Screening of *Poincianella pluviosa*. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4375, 29 nov. 2019.

DREISCHULTE, Tobias *et al.* Combined use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with diuretics and/or renin–angiotensin system inhibitors in the community increases the risk of acute kidney injury. **Kidney International**, v. 88, n. 2, p. 396–403, ago. 2015.

DUAN, Tianhao *et al.* Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 812774, 3 mar. 2022.

EBIHARA, Nachi *et al.* Suppressive Effect of Quercetin on Nitric Oxide Production from Nasal Epithelial Cells *In vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 6097625, jan. 2018.

EBIHARA, Nachi *et al.* Suppressive Effect of Quercetin on Nitric Oxide Production from Nasal Epithelial Cells *In vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. 1, p. 6097625, jan. 2018.

Effects and Mechanisms of Luteolin, a Plant-Based Flavonoid, in the Prevention of Cancers via Modulation of Inflammation and Cell Signaling Molecules. **Molecules**, v. 29, n. 5, p. 1093, 29 fev. 2024.

EL-ZAYAT, Salwa Refat; SIBALI, Hiba; MANNAA, Fathia A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 187, dez. 2019.

ETIENNE, Rachelle; PEREIRA DIAS VIEGAS, Flávia; VIEGAS JR., Claudio. Pathophysiological Aspects of Inflammation and Drug Design: an Updated Overview. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 167–191, 2021.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, n. 4, p. d12-26, 1997.

FESKE, Stefan. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 690–702, set. 2007.

FESKE, Stefan. CRAC channels and disease – From human CRAC channelopathies and animal models to novel drugs. **Cell Calcium**, v. 80, p. 112–116, jun. 2019.

FIGUEIREDO, Cristiane *et al.* Himatanthus drasticus Leaves: Chemical Characterization and Evaluation of Their Antimicrobial, Antibiofilm, Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 910, 31 maio 2017.

FIGUEIREDO, Cristiane *et al.* Himatanthus drasticus Leaves: Chemical Characterization and Evaluation of Their Antimicrobial, Antibiofilm, Antiproliferative Activities. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 910, 31 maio 2017.

FÖRSTERA, Benjamin *et al.* Potentiation of Gamma Aminobutyric Acid Receptors (GABAAR) by Ethanol: How Are Inhibitory Receptors Affected? **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, 6 maio 2016.

FRIES, Gabriel; GASSEN, Nils; REIN, Theo. The FKBP51 Glucocorticoid Receptor Co-Chaperone: Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2614, 5 dez. 2017.

FU, Li *et al.* ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W422–W431, 5 jul. 2024.

GINWALA, Rashida *et al.* Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, p. 35, 5 fev. 2019.

GIOVANNINI, Sara *et al.* ATAD5 deficiency alters DNA damage metabolism and sensitizes cells to PARP inhibition. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 9, p. 4928–4939, 21 maio 2020.

GLEESON, M. Paul *et al.* Probing the links between *in vitro* potency, ADMET and physicochemical parameters. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 197–208, mar. 2011.

GONZÁLEZ, R. *et al.* Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 331–362, 25 mar. 2011.

GUENGERICH, F. Peter. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70–83, 1 jan. 2008.

GUO, Qing *et al.* NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 53, 4 mar. 2024.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, Gloria *et al.* Luteolin, quercetin, genistein and quercetagenin inhibit the effects of lipopolysaccharide obtained from *Porphyromonas gingivalis* in H9c2 cardiomyoblasts. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 22, n. 1, p. 19, dez. 2017.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, Gloria *et al.* Luteolin, quercetin, genistein and quercetagenin inhibit the effects of lipopolysaccharide obtained from *Porphyromonas gingivalis* in H9c2 cardiomyoblasts. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 22, n. 1, p. 19, dez. 2017.

HAN, Limin *et al.* Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 95, n. 1, p. e13106, jan. 2022.

HARIRFOROOSH, Sam; ASGHAR, Waheed; JAMALI, Fakhreddin. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal,

Cardiovascular and Renal Complications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 5, p. 821, 27 jan. 2014.

HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & Development**, v. 26, n. 3, p. 203–234, 1 fev. 2012.

HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344–362, fev. 2008.

HENMI, Kayo *et al.* Methoxy- and Fluoro-chalcone Derivatives Arrest Cell Cycle Progression and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cell A375. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 1109–1113, 2009.

HENMI, Kayo *et al.* Methoxy- and Fluoro-chalcone Derivatives Arrest Cell Cycle Progression and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cell A375. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 1109–1113, 2009.

HOGAN, Patrick G. *et al.* Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. **Genes & Development**, v. 17, n. 18, p. 2205–2232, 15 set. 2003.

HOGAN, Patrick G.; LEWIS, Richard S.; RAO, Anjana. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 491–533, 1 mar. 2010.

HOSSEINZADE, A; SADEGHI, O; *et. al.,.* Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *[S.d.]*.

HOSSEINZADE, A; SADEGHI, O; *et. al.,.* Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *[S.d.]*.

HU, Xiaoyi *et al.* The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 402, 26 nov. 2021.

HUANG, Wen *et al.* NFAT and NF- κ B dynamically co-regulate TCR and CAR signaling responses in human T cells. **Cell Reports**, v. 42, n. 7, p. 112663, jul. 2023.

IRIE, Shinji *et al.* Suppressive Activity of Quercetin on Periostin Functions *In vitro. in vivo*, 2016.

IRVINE, Jennifer D. *et al.* MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 28–33, jan. 1999.

JIANG, Ze-Bo *et al.* Luteolin and its derivative apigenin suppress the inducible PD-L1 expression to improve anti-tumor immunity in KRAS-mutant lung cancer. **Cancer Letters**, v. 515, p. 36–48, set. 2021.

JIN, L.; HARRISON, S.C. **Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 13522–13526, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.212504399>. Acesso em: 21 out. 2025.

JIN, Zhen *et al.* Inhibition of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells by 7-hydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 865–874, 1 jul. 2017.

JIN, Zhen *et al.* Inhibition of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells by 7-hydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 865–874, 1 jul. 2017.

JOMOVA, Klaudia *et al.* Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 413, p. 111489, maio 2025.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking.** *Journal of Molecular Biology*, v. 267, p. 727–748, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>. Acesso em: 21 out. 2025.

JUNG, Woojin *et al.* Absorption Distribution Metabolism Excretion and Toxicity Property Prediction Utilizing a Pre-Trained Natural Language Processing Model and Its Applications in Early-Stage Drug Development. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 3, p. 382, 17 mar. 2024.

KANAZAWA Takanori. Development of Noninvasive Drug Delivery Systems to the Brain for the Treatment of Brain/Central Nervous System Diseases. **YAKUGAKU ZASSHI**, v. 138, n. 4, p. 443–450, 1 abr. 2018.

KANDA, Atsuhiko *et al.* Glucocorticoid-transactivated TSC22D3 attenuates hypoxia and diabetes-induced Müller glial galectin-1 expression via HIF-1 α destabilization. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 8, p. 4589–4599, abr. 2020.

KARIN, Michael; LIN, Anning. NF- κ B at the crossroads of life and death. **Nature Immunology**, v. 3, n. 3, p. 221–227, 1 mar. 2002.

KAUPPI, B.; JAKOB, C.; *et al.* The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 22748–22754, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M212711200>. Acesso em: 21 out. 2025.

KEMPURAJ, D. *et al.* Luteolin inhibits myelin basic protein-induced human mast cell activation and mast cell-dependent stimulation of Jurkat T cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 7, p. 1076–1084, dez. 2008.

KEMPURAJ, D. *et al.* Luteolin inhibits myelin basic protein-induced human mast cell activation and mast cell-dependent stimulation of Jurkat T cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 7, p. 1076–1084, dez. 2008.

KEMPURAJ, D. *et al.* Luteolin inhibits myelin basic protein-induced human mast cell activation and mast cell-dependent stimulation of Jurkat T cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 7, p. 1076–1084, dez. 2008.

KEMPURAJ, Duraisamy *et al.* Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 7, p. 934–944, 2005.

KEMPURAJ, Duraisamy *et al.* Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 7, p. 934–944, 2005.

KEMPURAJ, Duraisamy *et al.* Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 7, p. 934–944, ago. 2005a.

KEMPURAJ, Duraisamy *et al.* Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 7, p. 934–944, ago. 2005b.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; LI, Q.; SHOEMAKER, B.A.; THIESSEN, P.A.; YU, B. *et al.* **PubChem 2025 update**. *Nucleic Acids Research*, v. 53, p. D1516–D1525, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>. Acesso em: 21 out. 2025.

KIPANYULA, Maulilio John; KIMARO, Wahabu Hamisi; ETET, Paul F. Seke. The Emerging Roles of the Calcineurin-Nuclear Factor of Activated T-Lymphocytes Pathway in Nervous System Functions and Diseases. **Journal of Aging Research**, v. 2016, p. 1–20, 2016.

KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T.E. **Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS**. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, p. 84–96, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ci800298z>. Acesso em: 21 out. 2025.

KUWANO, Takashi *et al.* Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 2, p. 300–310, fev. 2004.

LEE, Kyoo-young *et al.* ATAD5 regulates the lifespan of DNA replication factories by modulating PCNA level on the chromatin. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 1, p. 31–44, 7 jan. 2013.

LENOIR, Camille *et al.* Influence of Inflammation on Cytochromes P450 Activity in Adults: A Systematic Review of the Literature. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 733935, 16 nov. 2021.

LI, Hao *et al.* Butin regulates the NLRP3/CASP-1/GSDMD pyroptosis axis to inhibit proliferation and pyroptosis in human fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 33090, 26 set. 2025.

LI, Hao *et al.* Butin regulates the NLRP3/CASP-1/GSDMD pyroptosis axis to inhibit proliferation and pyroptosis in human fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 33090, 26 set. 2025.

LIU, Xikui K.; LIN, Xin; GAFFEN, Sarah L. Crucial Role for Nuclear Factor of Activated T Cells in T Cell Receptor-mediated Regulation of Human Interleukin-17. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52762–52771, dez. 2004.

LÓPEZ-POSADAS, Rocío *et al.* Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495–506, ago. 2008.

LÓPEZ-POSADAS, Rocío *et al.* Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495–506, ago. 2008.

MACIAN, Fernando. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 6, p. 472–484, 1 jun. 2005.

MACIÁN, Fernando; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, Cristina; RAO, Anjana. Partners in transcription: NFAT and AP-1. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2476–2489, 30 abr. 2001.

MALEKI, Soheila J.; CRESPO, Jesus F.; CABANILLAS, Beatriz. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, nov. 2019.

MANOHARAN, Renuka Ramalingam *et al.* ROS signaling in innate immunity via oxidative protein modifications. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1359600, 7 mar. 2024.

MARTÍNEZ, Gricelis; MIJARES, Michael R.; DE SANCTIS, Juan B. Effects of Flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 84–104, 4 dez. 2019.

MARTÍNEZ, Gricelis; MIJARES, Michael R.; DE SANCTIS, Juan B. Effects of Flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 84–104, 4 dez. 2019.

MARTÍNEZ, Gricelis; MIJARES, Michael R.; DE SANCTIS, Juan B. Effects of Flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 84–104, 4 dez. 2019.

MATSUMURA, Eitaro *et al.* Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7980, 22 maio de 2018.

MEDZHITOV, Ruslan. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–826, 18 out. 2007.

MILENKOVIC, Uros *et al.* Pathophysiology and Future Therapeutic Perspectives for Resolving Fibrosis in Peyronie's Disease. **Sexual Medicine Reviews**, v. 7, n. 4, p. 679–689, out. 2019.

MISHRA, K. P. *et al.* Effect of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) flavone on immune system: an *in-vitro* approach. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 11, p. 1490–1495, nov. 2008.

MISHRA, K. P. *et al.* Effect of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) flavone on immune system: an *in-vitro* approach. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 11, p. 1490–1495, nov. 2008.

MITTELSTADT, Paul R.; ASHWELL, Jonathan D. Inhibition of AP-1 by the Glucocorticoid-inducible Protein GILZ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29603–29610, ago. 2001.

MITTELSTADT, Paul R.; ASHWELL, Jonathan D. Inhibition of AP-1 by the Glucocorticoid-inducible Protein GILZ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29603–29610, ago. 2001.

MOHAMMADPOUR, Zinat *et al.* Resveratrol suppresses hyperglycemia-induced activation of NF- κ B and AP-1 via c-Jun and RelA gene regulation. **Medical Journal of The Islamic Republic of Iran**, v. 32, n. 1, p. 51–56, 30 out. 2018.

MOHAMMADPOUR, Zinat *et al.* Resveratrol suppresses hyperglycemia-induced activation of NF- κ B and AP-1 via c-Jun and RelA gene regulation. **Medical Journal of The Islamic Republic of Iran**, v. 32, n. 1, p. 51–56, 30 out. 2018.

MONTELEONE, Giovanni *et al.* Immune-mediated inflammatory diseases: Common and different pathogenic and clinical features. **Autoimmunity Reviews**, v. 22, n. 10, p. 103410, out. 2023.

MOTTA, Luiz Frederico; CORREA, Gabriel Veloso; CEZÁRIO, Stephanie Priscila De Sousa. ANÁLISE FARMACOCINÉTICA E TOXICOLÓGICA IN SILICO PARA DERIVADOS DE FLAVONAS. *In*: CIENTÍFICA DIGITAL, Editora (Org.). **Open Science Research X**. 1. ed. [S.l.]: Editora Científica Digital, 2023. p. 175–191.

MÜLLER, Martin R.; RAO, Anjana. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 9, p. 645–656, set. 2010.

NCHIOZEM-NGNITEDEM, Vaderament-A. *et al.* Inhibition of Proinflammatory Cytokine Release by Flavones and Flavanones from the Leaves of *Dracaena steudneri* Engl. **Planta Medica**, v. 87, n. 03, p. 209–217, mar. 2021.

NEUHOFF, Sibylle *et al.* pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, n. 2–3, p. 211–220, jun. 2005.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NISHIZAKI, Yosuke *et al.* Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on *in vitro* reporter gene assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 16, p. 4706–4710, ago. 2009.

NISHIZAKI, Yosuke *et al.* Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on *in vitro* reporter gene assay. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 16, p. 4706–4710, ago. 2009.

NØRREGAARD, Rikke; KWON, Tae-Hwan; FRØKIÆR, Jørgen. Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 34, n. 4, p. 194–200, dez. 2015.

ORLIKOVA, Barbora *et al.* Methylendioxy flavonoids: Assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 173–180, set. 2014.

ORLIKOVA, Barbora *et al.* Methylendioxy flavonoids: Assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 173–180, set. 2014.

OTAKI, Amane; FURUTA, Atsuko; ASANO, Kazuhito. Quercetin-Induced Enhancement of Nasal Epithelial Cells' Ability to Produce Clara Cell 10-kD Protein *In vitro* and *In Vivo*. **Medicines**, v. 10, n. 4, p. 28, 21 abr. 2023.

OTAKI, Amane; FURUTA, Atsuko; ASANO, Kazuhito. Quercetin-Induced Enhancement of Nasal Epithelial Cells' Ability to Produce Clara Cell 10-kD Protein *In vitro* and *In Vivo*. **Medicines**, v. 10, n. 4, p. 28, 21 abr. 2023.

OWOR, Richard Oriko *et al.* Anti-inflammatory Flavanones and Flavones from *Tephrosia linearis*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 996–1004, 24 abr. 2020.

OWOR, Richard Oriko *et al.* Anti-inflammatory Flavanones and Flavones from *Tephrosia linearis*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 996–1004, 24 abr. 2020.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016.

PARDRIDGE, William M. Drug Transport across the Blood–Brain Barrier. 2012.

- PARK, Chung Mu; SONG, Young-Sun. Luteolin and luteolin-7- O -glucoside inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through modulation of NF- κ B/AP1/PI3K-Akt signaling cascades in RAW 264.7 cells. **Nutrition Research and Practice**, v. 7, n. 6, p. 423, 2013.
- PARVEEN, Sana *et al.* JAK-STAT Signaling in Autoimmunity and Cancer. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 14, p. 523–554, maio 2025.
- PATIL, Rajeshwari H. *et al.* Anti-Inflammatory Effect of Apigenin on LPS-Induced Proinflammatory Mediators and AP-1 Factors in Human Lung Epithelial Cells. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 138–147, fev. 2016.
- PATRIDGE, Eric *et al.* An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, fev. 2016.
- POLLI, James E.; CRISON, John R.; AMIDON, Gordon L. Novel Approach to the Analysis of *in vitro*–*in vivo* Relationships**Presented in part at the Ninth Annual Meeting and Exposition of the American Association of Pharmaceutical Scientists, San Diego, CA, November 1994. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 7, p. 753–760, jul. 1996.
- PRAKRIYA, Murali; LEWIS, Richard S. STORE-OPERATED CALCIUM CHANNELS. [S.d.].
- RAKATELI, Leonida; HUCHZERMEIER, Rosanna; VAN DER VORST, Emiel P. C. AhR, PXR and CAR: From Xenobiotic Receptors to Metabolic Sensors. **Cells**, v. 12, n. 23, p. 2752, 30 nov. 2023.
- RANNEH, Yazan *et al.* Crosstalk between reactive oxygen species and proinflammatory markers in developing various chronic diseases: a review. **Applied Biological Chemistry**, v. 60, n. 3, p. 327–338, jun. 2017.
- RAO, Anjana; LUO, Chun; HOGAN, Patrick G. TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY:Regulation and Function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 707–747, abr. 1997.
- RUIZ, Pedro A.; HALLER, Dirk. Functional Diversity of Flavonoids in the Inhibition of the Proinflammatory NF- κ B, IRF, and Akt Signaling Pathways in Murine Intestinal Epithelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p. 664–671, mar. 2006.
- SAMSON. **Integrative Molecular Design**. Disponível em: <https://www.samsonconnect.net>. Acesso em: 21 out. 2025.
- ŠARIĆ, Ana *et al.* Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 547–554, mar. 2009.
- ŠARIĆ, Ana *et al.* Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 547–554, mar. 2009a.

ŠARIĆ, Ana *et al.* Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 3, p. 547–554, mar. 2009b.

SAWADOGO, Wamtinga *et al.* Cytotoxic, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects of 5-Hydroxyl-6,7,3',4',5'-Pentamethoxyflavone Isolated from *Lantana ukambensis*. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 10388–10397, 10 dez. 2015.

SAWADOGO, Wamtinga *et al.* Cytotoxic, Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects of 5-Hydroxyl-6,7,3',4',5'-Pentamethoxyflavone Isolated from *Lantana ukambensis*. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 10388–10397, 10 dez. 2015.

SHAMSUDIN, Nur Farisya *et al.* Flavonoids as Antidiabetic and Anti-Inflammatory Agents: A Review on Structural Activity Relationship-Based Studies and MetaAnalysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 12605, 20 out. 2022.

SHARMA, Gitanjali *et al.* The Role of Cell-Penetrating Peptide and Transferrin on Enhanced Delivery of Drug to Brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 806, 25 maio 2016.

SILVA, M.; LANGER, Harald; GRAF, Tobias. Inflammatory and Molecular Pathways in Heart Failure—Ischemia, HFpEF and Transthyretin Cardiac Amyloidosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2322, 10 maio 2019.

SILVA, M.; LANGER, Harald; GRAF, Tobias. Inflammatory and Molecular Pathways in Heart Failure—Ischemia, HFpEF and Transthyretin Cardiac Amyloidosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2322, 10 maio 2019.

SILVA, M.; LANGER, Harald; GRAF, Tobias. Inflammatory and Molecular Pathways in Heart Failure—Ischemia, HFpEF and Transthyretin Cardiac Amyloidosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2322, 10 maio 2019.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Human physiology: an integrated approach**. Seventh edition ed. San Francisco: Pearson, 2016.

SINGH, Saurav *et al.* Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 90, n. 5, p. 985–996, nov. 2016.

SMITH, William L.; DEWITT, David L.; GARAVITO, R. Michael. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 145–182, jun. 2000.

SONG, Dandan; LIAN, Yan; ZHANG, Lin. The potential of activator protein 1 (AP-1) in cancer targeted therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1224892, 6 jul. 2023.

SONG, Dandan; LIAN, Yan; ZHANG, Lin. The potential of activator protein 1 (AP-1) in cancer targeted therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1224892, 6 jul. 2023.

- SOUZA, Jacqueline De; FREITAS, Zaida Maria F.; STORPIRTIS, Sílvia. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 515–527, dez. 2007.
- SUN, Shao-Cong. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 545–558, set. 2017.
- THEBTI, Amal *et al.* Antimicrobial Activities and Mode of Flavonoid Actions. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 225, 20 jan. 2023.
- TIMMERMANS, Steven; SOUFFRIAUX, Jolien; LIBERT, Claude. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1545, 4 jul. 2019.
- VAETH, Martin; FESKE, Stefan. NFAT control of immune function: New Frontiers for an Abiding Trooper. **F1000Research**, v. 7, p. 260, 2 mar. 2018.
- VERBEEK, Richard *et al.* The flavones luteolin and apigenin inhibit *in vitro* antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 621–629, ago. 2004.
- VERBEEK, Richard *et al.* The flavones luteolin and apigenin inhibit *in vitro* antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 621–629, ago. 2004.
- WANG, Yulan *et al.* *In silico* ADME/T modelling for rational drug design. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 48, n. 4, p. 488–515, nov. 2015.
- WARING, Michael J. Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates—Molecular weight dependent lower logD limits based on permeability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 10, p. 2844–2851, maio 2009.
- WEI, Kai *et al.* Icariin alters the expression of glucocorticoid receptor, FKBP5 and SGK1 in rat brains following exposure to chronic mild stress. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 1, p. 337–344, jul. 2016.
- WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways: **Journal of Molecular Medicine**, v. 74, n. 10, p. 589–607, out. 1996.
- WIKSTROM, Ac. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. **Journal of Endocrinology**, v. 178, n. 3, p. 331–337, 1 set. 2003.

XIN, Yanru *et al.* Recent progress on nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 3, p. 228, 2017.

XUE, Chen *et al.* Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 204, 19 maio 2023.

YEE, Donald L.; O'BRIEN, Sarah H.; YOUNG, Guy. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Anticoagulants in Paediatric Patients. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 52, n. 11, p. 967–980, nov. 2013.

YOU, Keun *et al.* Vitexicarpin, a Flavonoid from the Fruits of *Vitex rotundifolia*, Inhibits Mouse Lymphocyte Proliferation and Growth of Cell Lines *in vitro*. **Planta Medica**, v. 64, n. 06, p. 546–550, ago. 1998.

YOU, Keun *et al.* Vitexicarpin, a Flavonoid from the Fruits of *Vitex rotundifolia*, Inhibits Mouse Lymphocyte Proliferation and Growth of Cell Lines *in vitro*. **Planta Medica**, v. 64, n. 06, p. 546–550, ago. 1998.

YUAN, Hong *et al.* Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5671, set. 2015.

ZARGHI, Afshin; ARFAEI, Sara. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. 2011.

ZHAO, Mingzhe *et al.* Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12808, 26 nov. 2021.

ZHEN, J. *et al.* Inhibition of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells by 7-hydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 865–874, 1 jul. 2017.

ZHEN, J. *et al.* Inhibition of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells by 7-hydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 865–874, 1 jul. 2017.

ZHONG, Ruting *et al.* Anti-inflammatory activity of flavonols via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 macrophages. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 1176–1184, 2022.

ZHOU, Shu-Feng *et al.* Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. **Drug Metabolism Reviews**, v. 42, n. 2, p. 268–354, maio 2010.

ZHU, Jinfang; YAMANE, Hidehiro; PAUL, William E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 1 mar. 2010.

ZUGHAIBI, Torki A. *et al.* Targeting PI3K/Akt/mTOR Pathway by Different Flavonoids: A Cancer

ZUGHAIBI, Torki A. *et al.* Targeting PI3K/Akt/mTOR Pathway by Different Flavonoids: A Cancer Chemopreventive Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12455, 18 nov. 2021.

ANEXOS E APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Investigação da atividade imunomoduladora de produtos naturais em células humanas”.

Neste estudo pretendemos investigar a atividade imunomoduladora de produtos naturais (substâncias isoladas de plantas).

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Nome: _____

Data de nascimento: _____

Telefone: _____

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título da pesquisa: Investigação da atividade imunomoduladora de produtos naturais em células humanas.

Local de realização: SENAI CIMATEC

Pesquisador Responsável: Dr. Cássio Santana Meira – SENAI CIMATEC

1. Informações gerais

As células do sangue humano serão obtidas a partir de participantes. As células mononucleares do sangue periférico serão cultivadas Instituto SENAI de Sistemas Avançados de Saúde (ISI-SAS) do SENAI-CIMATEC e tratadas com substâncias extraídas de plantas. Iremos estudar o efeito que essas substâncias causam nesse grupo de células que representam uma das principais células responsáveis pelo sistema de defesa do nosso corpo. Os linfócitos também estão envolvidos no desenvolvimento de inflamação no nosso corpo. Diante disso, iremos testar se produtos naturais são capazes de modular essas células. O nosso objetivo final é desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias.

2. Descrição do estudo:

O objetivo do nosso estudo, para o qual **o (a) sr (a) está sendo convidado (a) a participar** é: investigar a atividade imunomoduladora de produtos naturais. Neste estudo, pretendemos obter células do sangue. Posteriormente essas células serão tratadas com produtos naturais.

Caso aceite participar deste estudo, o(a) Sr(a) concordará em ceder uma amostra sangue (18 mL), que será obtida a partir de veia do braço, sendo que a coleta será realizada por profissional capacitado. Este procedimento poderá gerar um desconforto mínimo no momento da punção da veia e em alguns casos pequeno acúmulo de sangue, formando hematoma local. Caso aconteça desconfortos muito grandes, podem ser resolvidos com analgesia e pomadas anti-inflamatórias, conforme avaliação do médico da equipe da pesquisa. Estas células serão levadas ao SENAI CIMATEC, onde serão utilizadas em estudos *in vitro*, isto é, pesquisas realizadas em laboratório, sempre preservando a sua identidade e confidencialidade dos dados. A confidencialidade desses dados será mantida através de codificações das amostras e os dados pessoais dos pacientes serão mantidos em arquivo digital com acesso apenas as 5 pessoas da equipe de pesquisa.

Esta pesquisa tem por objetivo produzir conhecimentos e avaliar o efeito do tratamento com produtos naturais, para que seja possível desenvolver novas alternativas terapêuticas imunomoduladoras. Participar dela não vai gerar para você nenhum benefício médico em curto prazo. Por este motivo, ao aceitar participar, o (a) sr (a) concordará que os pesquisadores utilizem o seu material (suas células) visando contribuir para o desenvolvimento da ciência.

Do mesmo modo, o (a) sr (a) também concordará com o descarte do material, que acontecerá ao final de cada experimento, sem necessidade de nova autorização.

A sua participação é inteiramente voluntária, não acarretará custos financeiros, e, caso mude de ideia quanto à participação no estudo, o (a) Sr(a) deve sentir-se livre para abandonar o estudo, sem qualquer prejuízo ou desconforto com a equipe do projeto.

Os resultados da pesquisa serão divulgados preservando o sigilo e, portanto, **a sua identidade não será revelada**. Durante todo o processo, haverá acompanhamento da equipe para cada participante, orientações, assistência integral, conforme o caso,

enquanto necessário, inclusive nas pesquisas de rastreamento. Diante de possíveis complicações/danos associados ao desenvolvimento da pesquisa, haverá garantias a assistência, indenização e ressarcimento.

Sinta-se à vontade para entrar em contato sempre que desejar tirar dúvidas ou solicitar maiores informações através dos telefones abaixo:

- SENAI CIMATEC - Av. Orlando Gomes, 1845 - Piatã, Salvador - BA, pelo telefone (71) 3534-8090 – Dr. Cássio Santana Meira
- Comitê de Ética do Campus Integrado de Manufatura e Tecnologia (CIMATEC)SENAI,/BAHIA– Av. Orlando Gomes, 1845 - Piatã, Salvador - BA pelo telefone (71) 3176-2375, e e-mail: cepcimatec@fieb.org.br.

Diante do exposto nos parágrafos anteriores, eu, firmado abaixo, concordo em participar do estudo:

Eu confirmo que li e compreendi a descrição do estudo de título “Investigação da atividade imunomoduladora de produtos naturais em células humanas” e pude questionar o pesquisador sobre todos os aspectos do estudo até estar satisfeito (a). Compreendo que a participação no estudo é totalmente voluntária. Estou ciente do propósito, do procedimento, dos riscos e dos benefícios do estudo, e isso me torna apto a participar. Estou ciente de que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar. O sangue colhido e as células obtidas a partir dela serão utilizados para este projeto e descartadas ao final de cada experimento.

Minha identidade jamais será publicada, e os dados colhidos permanecerão confidenciais.

Declaro que recebi uma via, de igual teor, deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado e datado.

Data e assinatura procedem que este tenha sido “Lido e Aprovado”.

1. Participante

a. Data: _

b. Nome:

c. Assinatura:

2. Pesquisador (a):

a. Data: _

b. Nome:

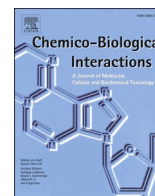
c. Assinatura:

3. Testemunha Imparcial:

a. Data: _

b. Nome:

Assinatura:



Research paper

In silico and *in vitro* investigation of the safety and immunomodulatory mechanisms of 7-hydroxyflavone



Vanessa da Silva Oliveira^a, Dahara Keyse Carvalho Silva^{b,c}, Maria Vitória Gomes das Neves^{b,c}, Sergio Santos Silva Junior^b, Jônatas Sousa Pires dos Santos^c, Claudia Valeria Campos de Souza^d, José Maria Barbosa Filho^e, Osvaldo Andrade Santos-Filho^d, Milena Botelho Pereira Soares^{b,c}, Cássio Santana Meira^{a,b,c,*}

^a Department of Life Sciences, State University of Bahia, Salvador, 40020-000, BA, Brazil

^b Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Salvador, 40296-710, BA, Brazil

^c Institute of Innovation in Advanced Health Systems (ISI SAS), University SENAI/CIMATEC, Salvador, 41650-010, BA, Brazil

^d Laboratory of Molecular Modeling and Computational Structural Biology, Walter Mors Natural Products Research Institute, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-599, RJ, Brazil

^e Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 58051-900, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

7-Hydroxyflavone
Immunomodulation
Calcineurin/NFAT pathway
Glucocorticoid receptor
Lymphocyte activation
In vitro assays

ABSTRACT

7-Hydroxyflavone (7HF) is a natural flavonoid with recognized antioxidant and anti-inflammatory properties, but its immunomodulatory potential and underlying molecular mechanisms remain poorly defined. This study investigated the immunomodulatory activity of 7HF in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and murine splenocytes through *in silico* and *in vitro* approaches. Pharmacokinetic and toxicity predictions were obtained with ProTox 3.0. Cytotoxicity and hemolysis assays evaluated the compound safety, whereas lymphoproliferation and cytokine secretion (IL-2 and IFN- γ) were analyzed in PHA- or ConA-stimulated cells with or without the glucocorticoid-receptor (GR) antagonist RU-486. The expression of inflammatory mediators and signaling molecules was quantified by RT-qPCR, and molecular docking assessed the affinity of 7HF for calcineurin and GR. 7HF showed favorable pharmacokinetic predictions, low acute toxicity, and moderate CC₅₀ values in murine splenocytes ($74.2 \pm 6.1 \mu\text{M}$) and human PBMCs ($60.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$), with no cytotoxic or hemolytic effects at immunomodulatory concentrations. The compound significantly inhibited lymphocyte proliferation and cytokine production in activated PBMCs and splenocytes, effects partially reversed by RU-486, indicating GR involvement. Gene-expression analysis revealed downregulation of calcineurin subunits (PPP3CA/B/C), PLCG1, NFAT1/2, and pro-inflammatory mediators, with additional modulation of PI3K/AKT, GR, NF- κ B/AP-1, and JAK/STAT pathways. Molecular docking confirmed stable interactions of 7HF with both calcineurin and GR, with ChemPLP scores comparable to dexamethasone. Overall, 7HF exhibited selective immunosuppressive activity by modulating multiple signaling pathways involved in lymphocyte activation, supporting its potential as a safe lead compound for developing novel therapeutic agents.

1. Introduction

Natural products remain a key source for drug development due to their chemical diversity and therapeutic potential. Derived from plants, microorganisms, and marine organisms, they have inspired the discovery of numerous therapeutic agents, including penicillin and paclitaxel, and over half of approved anticancer and anti-infective drugs are either

natural or synthetic derivatives based on natural scaffolds [1–3]. Their structural complexity enables diverse biological interactions, making them essential for developing new therapies, particularly against refractory diseases and emerging antimicrobial resistance [4].

Flavonoids are a large class of plant secondary metabolites comprising more than nine thousand identified structures and are abundantly found in fruits and vegetables [5]. They exhibit

* Corresponding author. Institute of Innovation in Advanced Health Systems (ISI SAS), University SENAI/CIMATEC, Salvador, 41650-010, BA, Brazil.
E-mail address: cassio.meira@fieb.org.br (C.S. Meira).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2026.111908>

Received 16 November 2025; Received in revised form 5 January 2026; Accepted 9 January 2026

Available online 10 January 2026

0009-2797/© 2026 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

cardioprotective [6], antibacterial [7], antifungal [8], antiviral [9], anticancer [10], antioxidant, and immunomodulatory [11] activities by modulating key intracellular signaling pathways, including NF- κ B, NFAT, and MAPKs [12]. These modulations result in the downregulation of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-2, and TNF- α , along with decreased production of reactive oxygen and nitrogen species [13]. Among the various subclasses of flavonoids, flavones are characterized by a C2–C3 double bond and a C4 carbonyl group, features that confer planarity, structural stability, and enable diverse biological interactions [14–17]. Owing to these structural characteristics and their broad biological potential, flavones have been widely investigated for their immunomodulatory properties.

Several flavones have demonstrated significant effects on immune regulation. For instance, vitexicarpin inhibited LPS-induced macrophage activation and nitric oxide production [18], while flavones isolated from *Boerhaavia diffusa*, *Dracaena steudneri*, and seabuckthorn suppressed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) proliferation and downregulated cytokines such as IL-2, TNF- α , and GM-CSF ([19,20, 13]). Similarly, quercetin, luteolin, and apigenin have been shown to modulate PBMCs proliferation and cytokine secretion [14,21,22], with luteolin also inhibiting mast cell activation and thereby indirectly affecting T cell responses [23].

Within this subclass, 7-hydroxyflavone (7HF) has gained particular attention due to its ability to modulate inflammation and oxidative stress. Experimental studies have shown that 7HF suppresses IL-1 β , IL-6, and TNF- α production and inhibits the activation of key pro-inflammatory pathways such as NF- κ B, MAPK, and the NLRP3 inflammasome, leading to reduced cellular infiltration and tissue damage in models of colitis, arthritis, and neuroinflammation [16,17].

Despite this growing body of evidence, direct studies on lymphocyte subsets remain limited, revealing a critical gap in understanding the specific effects of 7HF on lymphocyte activation. Therefore, the present study aims to evaluate the effects of 7HF on lymphocyte function in both murine and human cells and to elucidate its influence on classical immunosuppressive signaling pathways.

2. Materials and methods

2.1. Molecules under study

7HF was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA; purity $\geq 98\%$). For biological assays, 7HF was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Éxodo Científica, Brazil) and subsequently diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Gentian violet (Synth, Diadema, SP, Brazil) was used as a positive control in cytotoxicity assays. Dexamethasone (Sigma-Aldrich) was employed as a positive control in immunomodulatory assays, whereas mifepristone (RU-486; Sigma-Aldrich) was used as a glucocorticoid receptor antagonist in lymphoproliferation assays.

2.2. In silico toxicity assessment

The *in silico* toxicity of 7HF was evaluated using ProTox 3.0 (http://tox.charite.de/protox_3/; accessed on July 30, 2025), which predicts toxicological properties based on molecular descriptors. The 7HF structure in SMILES format was uploaded to the platform, and key endpoints of toxicity were analyzed. Predictions were generated using the tool's advanced machine learning models, trained on extensive toxicological datasets. The results provided insights into the potential safety profile of 7HF, supporting subsequent experimental validation efforts.

2.3. Splenocyte preparation

BALB/c mice (4–8 weeks old) from the Gonçalo Moniz Institute

(Salvador, Brazil) were maintained under controlled conditions with food and water *ad libitum*. Mice were euthanized, and spleens were aseptically removed and placed in serum-free DMEM. Tissues were macerated to obtain splenocyte suspensions, which were washed twice with saline and resuspended in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS; GIBCO) and 1 % penicillin–streptomycin (GIBCO). All procedures were approved by the institutional ethics committee (L-IGM-007/24).

2.4. PBMCs collection

PBMCs were isolated from 18 mL of peripheral venous blood collected in heparinized tubes, following RDC No. 153/2004. Mononuclear cells were obtained by Ficoll gradient centrifugation (Sigma-Aldrich). Informed consent was obtained from all enrolled subjects, and the Institutional research boarding of the University SENAI CIMATEC approved this study (Protocol 41.650-010).

2.5. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated in splenocytes from BALB/c mice and PBMCs from human donors. Cells were seeded in 96-well plates at densities of 5×10^6 cells/mL (splenocytes) or 1.5×10^6 cells/mL (PBMCs) and treated for 72 h with 7-hydroxyflavone (7HF; 1.25–160 μ M), dexamethasone (1.25–160 μ M), or gentian violet (0.15–20 μ M). Cell viability was assessed by the MTT assay. After the 72-h treatment period, cells were incubated with MTT solution (0.5 mg/mL; Sigma-Aldrich) for 4 h at 37 °C. After plate centrifugation, the resulting formazan crystals were solubilized with 100 μ L of DMSO, and absorbance was measured at 550 nm using a spectrophotometer. The cytotoxic concentration of 50 % (CC₅₀) was calculated based on MTT results.

In parallel, for membrane integrity assessment, cells were seeded in 24-well plates at densities of 5×10^6 cells/mL (splenocytes) or 1×10^6 cells/mL (PBMCs) and treated for 72 h with 7-hydroxyflavone (7HF; 10, 20, and 40 μ M), dexamethasone (10 μ M), or gentian violet (10 μ M). Then, cells were centrifuged, washed twice with saline or PBS, and stained with propidium iodide (2 μ g/mL; Sigma-Aldrich) for 15 min in the dark. Data acquisition was performed on a BD LSRFortessa™ flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA), collecting 10,000 events per sample, and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

2.6. Hemolysis assay

The hemolytic activity of 7HF was evaluated using peripheral human blood collected in heparinized tubes. Samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min at 4 °C, and erythrocytes were washed repeatedly with phosphate-buffered saline (PBS 1x) until the supernatant was clear. For the assay, 100 μ L of 7HF at different concentrations, diluted in sterile saline or PBS, was incubated with 100 μ L of a 1 % erythrocyte suspension in 96-well microplates at 37 °C and 5 % CO₂ for 1 h. A 1 % saponin solution (Sigma-Aldrich; 0.1 g/10 mL) or 0.5 % Triton X-100 solution (Sigma-Aldrich) was used as a positive control for 100 % hemolysis. After incubation, plates were centrifuged at 1500 rpm for 10 min, and 100 μ L of the supernatant was transferred to new U-bottom 96-well plates. Absorbance was measured at 540 nm using a microplate spectrophotometer.

2.7. Lymphoproliferation

The antiproliferative effect of 7HF was evaluated in splenocytes from BALB/c mice and PBMCs from human donors. Splenocytes (1×10^6 cells/well) and PBMCs (3×10^5 cells/well) were seeded in 96-well plates and cultured in DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % penicillin–streptomycin. Cells were stimulated with concanavalin A (ConA, 2 μ g/mL; Sigma-Aldrich) or phytohemagglutinin (PHA, 2.5 μ g/mL;

Sigma-Aldrich) for murine and human assays, respectively, and treated for 72 h with 7HF (10, 20, or 40 μM). Dexamethasone (10 μM) was used as a positive control, and mifepristone (RU-486; 10 μM) as a glucocorticoid receptor antagonist in human PBMCs assays. After incubation, plates were centrifuged (1500 rpm, 10 min), and 100 μL of CellTiter-Glo® reagent (Promega, Madison, WI, USA) was added to each well. Luminescence was measured using a SpectraMax® iD3 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), and results were expressed as relative light units (RLU).

2.8. Cytokine quantification

To evaluate the effect of 7HF on cytokine production, splenocytes from BALB/c mice and PBMCs from human donors were cultured in 96-well plates at densities of 1×10^6 and 3×10^5 cells/well, respectively, in DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % penicillin-streptomycin. Cells were stimulated with ConA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or phytohemagglutinin (PHA, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for murine and human assays, respectively, and treated for 24 h with 7HF (10, 20, or 40 μM) or dexamethasone (10 μM). After incubation, culture supernatants were collected, and IL-2 and IFN- γ concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using DuoSet kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions.

2.9. Gene expression analysis

Total RNA was extracted from PBMCs treated or not with 7HF (40 μM) for 3 h and subsequently stimulated or not with PHA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 3 h, using TRIzol reagent (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). cDNA synthesis was performed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative PCR (qPCR) reactions were carried out using SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI 7500 Real-Time PCR System under standard cycling conditions. Gene expression of *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3CC*, *CALM1*, *CALM2*, *CALM3*, *NFAT1*, *NFAT2*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *AKT2*, *SGK1*, *STAT5A*, *STAT6*, *IL2*, *IL2RA*, *IL6*, *IFNG*, *PTGS2*, *IKBA*, *IKB β* , *DUSP1*, *FKBP5*, *TSC22D3*, *JUN*, *FOS*, and *PLCG1* was analyzed in quadruplicate (Table S1). No-template (NTC) and no-reverse transcription (No-RT) controls were included. Expression levels were normalized to *GAPDH* and calculated using the comparative threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) as described by Schmittgen and Livak [24]. PCR reactions were performed for up to 40 cycles, and amplification signals with Cq values < 40 were considered detectable. The normalized expression matrix was \log_2 -transformed, and each gene was standardized using z-score normalization across samples to highlight relative expression patterns. The resulting dataset was visualized as a clustered heatmap generated in Microsoft Excel (Microsoft 365; Microsoft Corporation, Redmond, WA) using a blue–yellow–red color gradient, where blue indicates high expression, yellow indicates mean expression, and red indicates low expression levels.

2.10. Computational chemistry

2.10.1. Ligands and proteins structures

The structure of dexamethasone and 7-hydroxyflavone were obtained from the PubChem database [25] under the PubChem CIDs 5743 and 5281894, respectively. The protein structures were obtained from Protein Data Bank [26], under the PDB IDs: 1MF8 (calcineurin) and 1NHZ (glucocorticoid receptor) [27].

2.10.2. Molecular docking

Molecular docking simulations were performed with GOLD 2025.1.0, a protein–ligand docking software based on a genetic algorithm (GA) [28]. The ChemPLP scoring function [29], as well as default GA parameters were used. Such a scoring function does not have a physical unit, such as kcal/mol. The value it provides is an empirical

score, that is, a dimensionless number used to classify and rank the docking poses between a ligand and a protein. In order to determine the binding site where dexamethasone and 7-hydroxyflavone were docked into calcineurin, a sphere with a radius equal to 10 Å was defined, with the geometric center of the co-crystallized cyclosporin A ($x = -36.05$ Å, $y = 16.68$ Å, and $z = 21.64$ Å). Whereas for determining the binding site for glucocorticoid receptor, the sphere with the same radius (10 Å) was defined based on the geometric center of the co-crystallized antagonist RU-486 ($x = -2.24$ Å, $y = 12.42$ Å, and $z = 3.40$ Å). Moreover, for glucocorticoid receptor, a water molecule with the geometric center equal to $x = -2.32$ Å, $y = 7.00$ Å, and $z = 5.18$ Å was kept in the system.

2.10.3. Visualization tools

Molecular visualizations were performed using BIOVIA Discovery Studio 2021 [30] and SAMSON 2025 R3 (9.0.0) softwares.

2.11. Statistical analysis

All experiments using murine cells were performed in three independent assays, whereas experiments involving human cells were conducted in three independent assays using PBMCs obtained from three distinct healthy donors. Data were analyzed using Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test, as appropriate. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), and differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. In silico assays

7HF (Fig. 1A) was evaluated using ProTox 3.0 to predict its pharmacokinetic, pharmacodynamics, and toxicological properties, applying a probability threshold of 0.7 to be defined as significant predictions.

As shown in Table 1, among the categories with probabilities above the 0.7 cutoff, the compound showed a high predicted likelihood of being inactive for neurotoxicity (0.77), cytotoxicity (0.71), and immunotoxicity (0.98), indicating a low potential for adverse effects related to these endpoints. In contrast, the molecule exhibited a high probability of being active for respiratory toxicity (0.79) and nutritional toxicity (0.73), suggesting potential risks that warrant further experimental evaluation.

Using the ProTox 3.0 platform, the potential interaction of 7HF with cytochrome P450 (CYP450) isoenzymes was also evaluated. Among the analyzed isoforms, CYP2E1 and CYP2D6 were predicted to be inactive, whereas CYP2C9 (activation score = 0,70) and CYP1A2 (activation score = 0,97) were predicted to be active (Fig. 1B). It is important to note that these predictions are qualitative and exploratory, reflecting the probability of interaction with specific CYP450 isoforms rather than experimentally validated effects on substrate metabolism. Therefore, no conclusions can be drawn regarding enzyme induction, inhibition, or alterations in metabolic rates based solely on these *in silico* data.

In addition to cytochrome P450 isoenzymes, the ProTox 3.0 platform also enables the evaluation of potential activation or inhibition of cellular receptors, transcription factors, and enzymes involved in essential biological processes, such as metabolism, inflammatory responses, hormonal regulation, and signaling pathway modulation. For 7HF, potential activations were predicted for the aryl hydrocarbon receptor (AhR), androgen receptor ligand-binding domain (AR-LBD), estrogen receptor/estrogen receptor ligand-binding domain (ER/ER-LBD), matrix metalloproteinases (MMPs), and aromatase (Fig. S1).

3.2. In vitro assays

In the biological assays, the cytotoxic potential of 7-hydroxyflavone (7HF) was initially evaluated in murine splenocytes and human

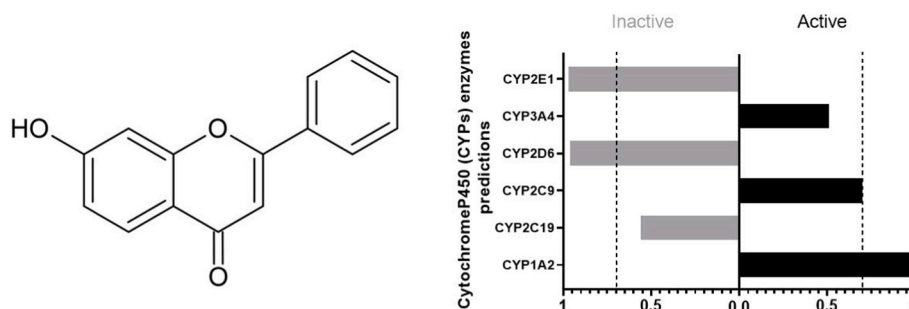


Fig. 1. Chemical structure of 7HF (A) and *in silico* prediction of its interactions with cytochrome P450 enzymes (B). The graph depicts CYP450 isoforms predicted as active (black) or inactive (gray) in the metabolism of 7HF. Values above 0.7 indicate a potential interaction of the compound with specific CYP450 enzymes, suggesting possible modulation of their activity.

Table 1
Organ- and endpoint-specific toxicity predictions.

Organ Toxicity or Toxicity endpoints	Prediction	Probability
Hepatotoxicity	Inactive	0.65
Neurotoxicity	Inactive	0.77
Nephrotoxicity	Active	0.57
Respiratory Toxicity	Active	0.79
Cardiotoxicity	Inactive	0.67
Carcinogenicity	Inactive	0.50
Immunotoxicity	Inactive	0.98
Mutagenicity	Inactive	0.60
Cytotoxicity	Inactive	0.71
BBB-barrier	Active	0.55
Ecotoxicity	Active	0.57
Clinical toxicity	Active	0.58
Nutritional toxicity	Active	0.73

A probability value greater than 0.7 was used as the cutoff to define significant predictions.

peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). As shown in Table 2, 7HF exhibited moderate cytotoxicity in both cell types, with CC_{50} values of $74.2 \pm 6.1 \mu\text{M}$ in murine splenocytes and $60.1 \pm 1.9 \mu\text{M}$ in human PBMCs. Dexamethasone displayed a comparable cytotoxicity profile, with CC_{50} values of $94.6 \pm 1.8 \mu\text{M}$ and $67.7 \pm 11.6 \mu\text{M}$ in splenocytes and PBMCs, respectively. In contrast, gentian violet, a well-recognized cytotoxic compound, showed pronounced toxicity in both cell populations, with CC_{50} values of $0.62 \pm 0.1 \mu\text{M}$ for splenocytes and $0.45 \pm 0.0 \mu\text{M}$ for PBMCs.

To further confirm the cytotoxicity profile, additional viability analyses were performed using propidium iodide staining and flow cytometry. Consistent with the MTT data, 7HF did not exhibit significant cytotoxic effects at the concentrations selected for subsequent functional assays, as evidenced by the absence of increased PI-positive cell populations (Fig. S2A–G). Accordingly, the hemolytic potential of 7HF was evaluated in human erythrocytes, with saponin and Triton X-100 used as positive controls. In agreement with the cellular viability data, 7HF did not induce detectable hemolysis at any of the tested concentrations (Fig. S2I). Collectively, these results demonstrate that the

Table 2
In vitro cytotoxicity profile of 7H in splenocytes isolated from BALB/c mice and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from human donors.

Compounds	CC_{50} (μM) Splenocytes	CC_{50} (μM) PBMCs
7HF	$74.2 (\pm 6.1)$	$60.1 (\pm 1.9)$
Dexamethasone	$94.6 (\pm 1.8)$	$67.7 (\pm 11.6)$
Gentian Violet	$0.62 (\pm 0.1)$	$0.45 (\pm 0.0)$

Values represent the mean \pm S.D. and were calculated from three independent experiments performed. CC_{50} = cytotoxic concentration at 50%. S.D. = standard deviation.

concentrations of 7HF employed in the subsequent experiments were non-cytotoxic and biologically safe, supporting the interpretation that the observed immunomodulatory effects are not secondary to nonspecific cytotoxicity.

After determining the non-cytotoxic concentration range of 7HF, its antiproliferative and immunosuppressive effects on cytokine production were evaluated. Treatment of ConA-activated murine splenocytes with 7HF (10, 20, and 40 μM) significantly inhibited cell proliferation by approximately 10%, 24%, and 58%, respectively, compared with the stimulated control ($p < 0.05$), while dexamethasone (10 μM) induced about 81% inhibition (Fig. 2A). In parallel, 7HF markedly reduced interleukin-2 (IL-2) production in BALB/c splenocytes at all tested concentrations, with decreases of around 15%, 56%, and 84%, respectively ($p < 0.05$), whereas dexamethasone reduced IL-2 by about 62% (Fig. 2B). Similarly, 7HF significantly decreased interferon-gamma (IFN- γ) levels by 39%, 51%, and 61% at 10, 20, and 40 μM , respectively ($p < 0.05$), confirming its immunosuppressive potential (Fig. 2C).

In human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with PHA (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and treated with 7HF at concentrations of 10, 20, and 40 μM , a significant inhibition of cell proliferation was observed, approximately 16%, 34%, and 78%, respectively, compared to the stimulated control ($p < 0.05$). Dexamethasone (10 μM) reduced proliferation by 59% (Fig. 2D). Similar to the results observed in splenocytes, 7HF also decreased IL-2 production by 15%, 27%, and 44% (Fig. 2E) and IFN- γ production by 23%, 50%, and 73%, respectively (Fig. 2F).

Considering the observed immunosuppressive profile, we investigated whether the effect of 7HF could be associated with the glucocorticoid receptor (GR)-mediated signaling pathway. PBMCs were treated in the presence or absence of the GR antagonist mifepristone (RU-486, 10 μM) (Fig. 3). Treatment with 7HF (40 μM) significantly reduced lymphocyte proliferation by approximately 67% relative to the stimulated, untreated control ($C-$; $p < 0.05$). However, pretreatment with RU-486 partially reversed this effect, resulting in only 36% inhibition, suggesting that the antiproliferative activity of 7HF is at least partially mediated through GR activation. Similarly, dexamethasone inhibited lymphocyte proliferation by about 60%, and its effect was significantly reversed in the presence of RU-486 ($p < 0.05$), further supporting the involvement of the GR pathway.

To explore the molecular basis of 7HF-mediated immunoregulation, the expression profile of genes involved in lymphocyte activation and inflammatory signaling was assessed by RT-qPCR and visualized as a heatmap or graphs (Fig. 4 and S3). Human PBMCs were pretreated with 7HF (40 μM) for 3 h and subsequently stimulated with PHA. The heatmap revealed a broad transcriptional modulation characterized by the downregulation of genes encoding calcineurin subunits (*PPP3CA*, *PPP3CB*, and *PPP3CC*) and downstream components of the Ca^{2+} /calcineurin/NFAT pathway, including *NFAT1*, *NFAT2*, and *PLCG1*. Interestingly, *CALM1* and *CALM2* displayed increased expression, suggesting a compensatory activation of the calmodulin pathway, while *CALM3* expression was decreased.

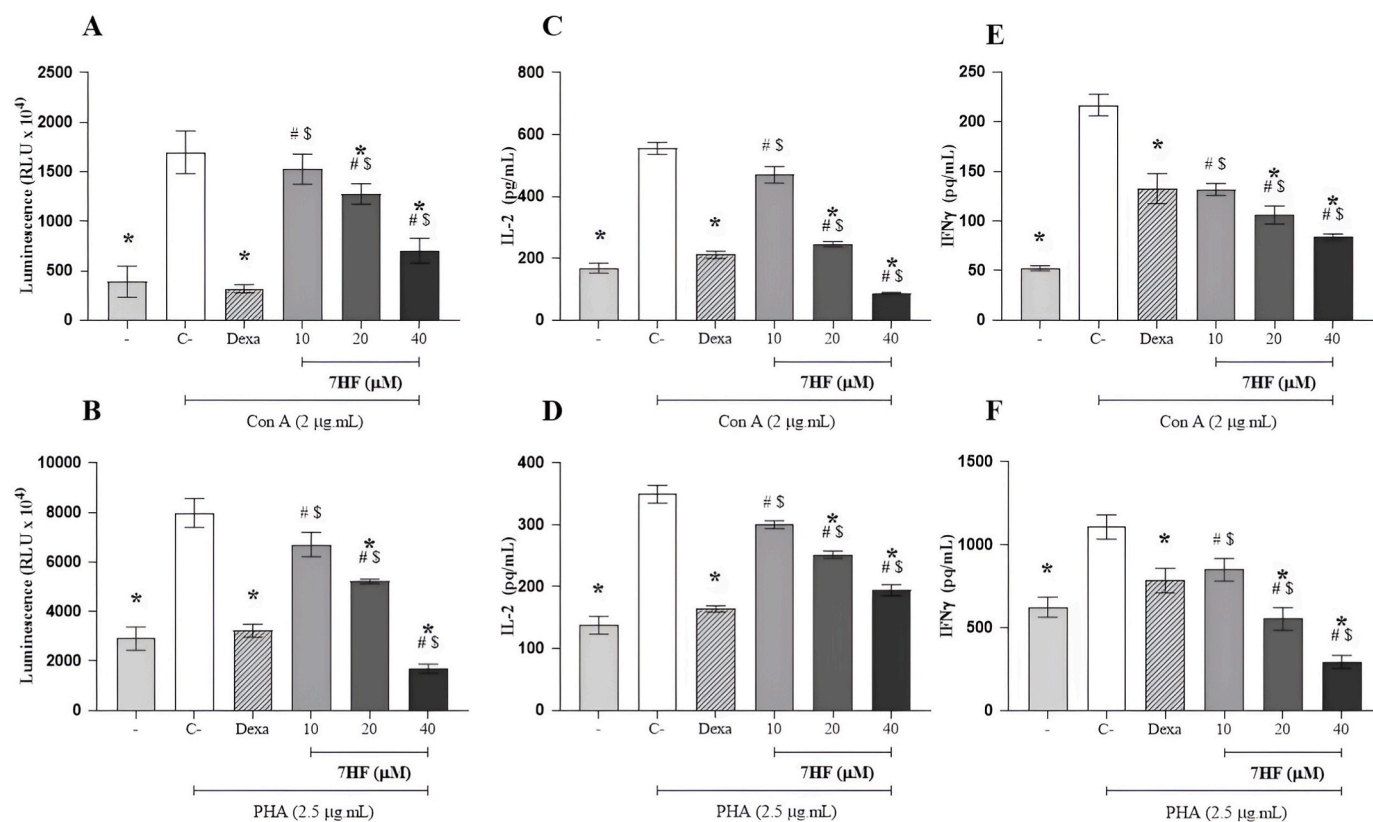


Fig. 2. 7HF inhibits lymphocyte proliferation and cytokine secretion in murine splenocytes and human PBMCs. (A–B) Lymphocyte proliferation in murine splenocytes (A) and human PBMCs (B) stimulated with Con A or PHA, respectively, in the presence of increasing concentrations of 7HF. (C–F) IL-2 (C, splenocytes; D, PBMCs) and IFN- γ (E, splenocytes; F, PBMCs) levels in culture supernatants after treatment with 7HF. (G) Dexamethasone (Dexa, 10 μ M) was used as a positive control. The values represent the means \pm S.D. of four determinations obtained in one of the three experiments performed. $p < 0.05$ vs. stimulated untreated cells (C-); # $p > 0.05$ vs. Dexa; \$ $p > 0.05$ vs. unstimulated untreated cells (-).

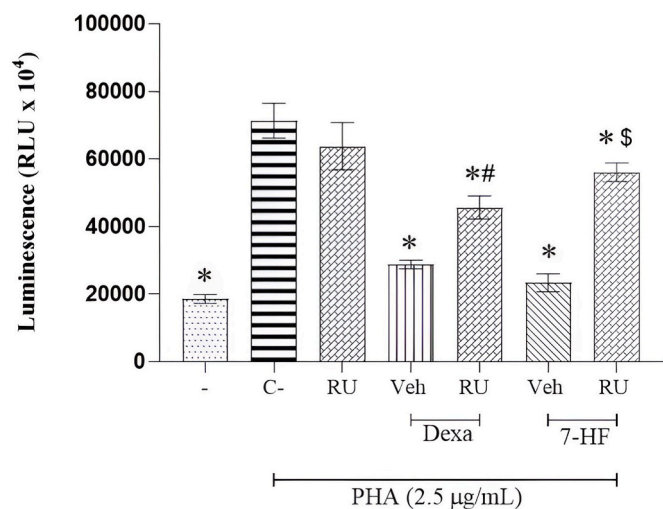


Fig. 3. Effect of 7HF on lymphocyte proliferation in the presence of the glucocorticoid receptor antagonist RU-486. Cells were treated with 7HF (40 μ M) or dexamethasone (Dexa; 10 μ M). In some cultures, cells were treated with these compounds in the presence of RU-486 (glucocorticoid receptor antagonist, RU; 10 μ M) “-” indicates unstimulated and untreated cells, whereas C- refers to stimulated but untreated cells (PHA, 2.5 μ g/mL). Veh = Vehicle. The values represent the means \pm S.D. of four determinations obtained in one of the three experiments performed. $p < 0.05$ compared to stimulated and untreated cells; # $p < 0.05$ compared to stimulated and treated with dexamethasone; \$ $p < 0.05$ compared to 7HF-treated cells.

Additionally, genes associated with PI3K/AKT signaling, such as *PIK3CA*, *PIK3CB*, and *AKT2*, were downregulated, consistent with the inhibition of survival-related pathways. The treatment also reduced the expression of glucocorticoid receptor (GR)-responsive genes (*TSC22D3*, *SGK1*, *FKBP5*, and *DUSP1*) and key transcription factors linked to pro-inflammatory responses (*JUN*, *FOS*, and *IKB β*), while maintaining *IKB α* expression. Inflammatory mediators, including *IL2*, *IL2RA*, *IL6*, *IFN- γ* , and *PTGS2*, also showed decreased expression, whereas modest modulation of *STAT5A* and *STAT6* suggested partial interference with cytokine-driven differentiation pathways.

3.3. Docking simulations

The docking protocol was validated by redocking of the co-crystallized ligands cyclosporin A (calcineurin) and RU-486 (glucocorticoid receptor), which yielded RMSD values below 2.0 \AA , confirming the reliability of the docking procedure (Fig. S4).

To further support these findings and investigate whether 7HF directly interacts with calcineurin, molecular docking analyses were performed. Fig. 5A and C show dexamethasone interacts with calcineurin through a hydrogen bond with chain C (Asn102) and π -alkyl interactions with chain A (Trp362 and Phe356), as well as van der Waals contacts with Ser353. The corresponding ChemPLP docking score was 54.95. Fig. 5B and D illustrate the interactions of 7-hydroxyflavone with calcineurin. This compound interacts with chain A (Pro355: π -alkyl; Trp352 and Phe356: π - π stacking) and with chain B (Met118: π -alkyl). The corresponding ChemPLP score was 57.05, suggesting a stable interaction comparable to that of dexamethasone, in line with its GR- and calcineurin-associated immunosuppressive effects. A general

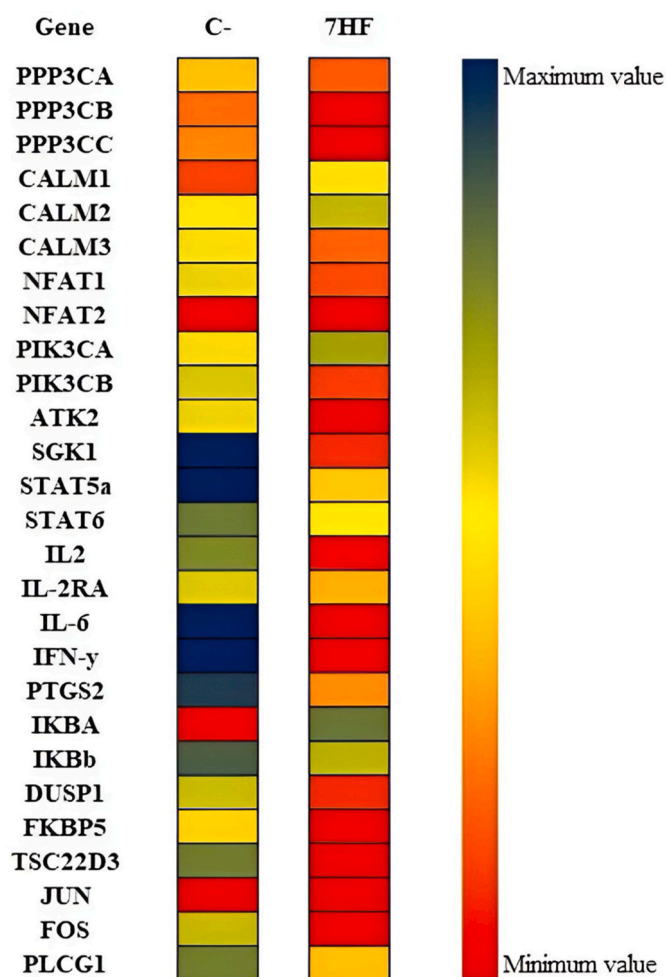


Fig. 4. Heatmap of gene expression associated with inflammatory and GR-mediated pathways. PBMCs were pretreated or not with 7HF (40 μ M) for 3 h and then stimulated with PHA (2.5 μ g/mL) for 3 h. Expression levels of genes related to the Ca^{2+} /calcineurin/NFAT pathway (PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC, CALM1, CALM2, CALM3, NFAT1, NFAT2, and PLCG1), GR signaling (TSC22D3, SGK1, FKBP5, and DUSP1), cytokine response (IL2, IL2RA, IL6, IFN- γ , and PTGS2), and transcriptional regulation (JUN, FOS, IKBA, IKB β , STAT5A, and STAT6) were analyzed by qRT-PCR. Colors represent relative expression values normalized by z-score, ranging from minimum (red) to maximum (blue) expression.

overview of the docking pose of dexamethasone and 7HF within the calcineurin binding pocket is provided in Figs. S5 and S6.

As shown in Fig. 6A and C, dexamethasone binds to the glucocorticoid receptor (GR; chain A), with a ChemPLP docking score of 65.35. Fig. 6B and D illustrate the binding interactions of 7-hydroxyflavone (7HF) with the same receptor, showing a ChemPLP score of 49.54. The interaction profiles suggest that both ligands occupy the GR active site, although dexamethasone displays a stronger predicted affinity. A general overview of the docking pose of dexamethasone and 7HF within the glucocorticoid receptor binding pocket is provided in Figs. S7 and S8.

From a molecular modeling perspective, 7-hydroxyflavone (7HF) can be considered a potential inhibitor of both protein targets. The ChemPLP scores for calcineurin (54.95 and 57.05) indicate a slightly higher docking affinity for 7HF than for dexamethasone. In contrast, 7HF exhibited a lower predicted affinity toward the glucocorticoid receptor (49.54 and 65.35). However, as shown in Fig. 5B, dexamethasone displayed an unfavorable steric clash with Met604, resulting from the close proximity between the ligand's methyl groups and the residue. This

steric hindrance suggests that minor conformational adjustments in dexamethasone could alleviate the clash, leading both compounds to display comparable binding affinities for the glucocorticoid receptor.

4. Discussion

This study demonstrates that 7HF exerts a selective immunomodulatory effect through the coordinated modulation of key molecular pathways involved in lymphocyte activation. By integrating *in silico* predictions with *in vitro* functional and molecular assays, we show that 7HF presents a favorable safety profile, lacks cytotoxic and hemolytic effects at biologically relevant concentrations, and effectively suppresses lymphoproliferation and pro-inflammatory cytokine production in activated immune cells. Mechanistically, these effects are primarily associated with inhibition of the Ca^{2+} /calcineurin/NFAT axis and partial engagement of glucocorticoid receptor (GR)-dependent signaling, resulting in controlled immunosuppression without compromising basal cellular viability.

Importantly, our findings are consistent with previous *in vivo* evidence suggesting an immunoregulatory role for 7HF. Earlier studies demonstrated that 7HF reduces paw edema and inflammatory cell infiltration in lipopolysaccharide-induced inflammatory models and suppresses delayed-type hypersensitivity reactions in mice, supporting its immunomodulatory activity beyond *in vitro* systems [31,32]. In addition, related flavones such as 7,8-dihydroxyflavone have been shown to attenuate inflammation through inhibition of NF- κ B signaling *in vivo*, indicating convergence between our molecular data and previously reported anti-inflammatory outcomes [33].

When compared with structurally related flavones, including luteolin and apigenin, 7HF displays a mechanistic profile that aligns with inhibition of Ca^{2+} -dependent signaling and suppression of pro-inflammatory cytokines. Luteolin has been reported to inhibit NFAT-dependent transcription and NF- κ B-mediated inflammation in T lymphocytes [34,35], while apigenin suppresses IL-2 and IFN- γ production and T-cell activation *in vivo*. Similar to these compounds, 7HF also exhibits GR-related signaling properties. However, comparative studies among flavone subclasses suggest that 7HF may present a more selective immunosuppressive profile, preferentially targeting activated immune cells rather than exerting broad cytotoxic effects. This selectivity is particularly relevant from a therapeutic perspective, as it reduces the risk of generalized immunosuppression [36,37].

Available toxicological evidence further supports the favorable safety profile of 7HF. *In vivo* studies in rodents report low systemic toxicity, absence of lethality following acute oral administration at doses up to 2000 mg/kg, and no detectable pathological alterations in hepatic, renal, or hematological parameters [31,33]. Additionally, hepatoprotective and antioxidant effects of 7HF have been described in experimental models, reinforcing its biological compatibility [38]. Nonetheless, most toxicological data are derived from acute exposure studies, highlighting the need for additional pharmacokinetic and chronic toxicity evaluations before clinical translation can be considered.

Consistent with these observations, *in silico* toxicity analysis using ProTox 3.0 predicted a low toxicological risk for 7HF, with no indication of cytotoxic, immunotoxic, mutagenic, or carcinogenic potential. Among cytochrome P450 isoenzymes, CYP2E1 and CYP2D6 were predicted to be inactive, suggesting a low likelihood of interference with major hepatic xenobiotic metabolism pathways. This finding is particularly relevant in inflammatory conditions, where alterations in CYP activity can influence both drug clearance and endogenous mediator metabolism [39–41]. In contrast, ProTox predictions indicated potential activation of CYP1A2 and CYP2C9, suggesting that 7HF may modulate these isoenzymes. CYP1A2, responsible for the metabolism of compounds such as caffeine, theophylline, and several antidepressants, is itself regulated by pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-1 β [39,42]. Additionally, CYP2C9 participates in the conversion of

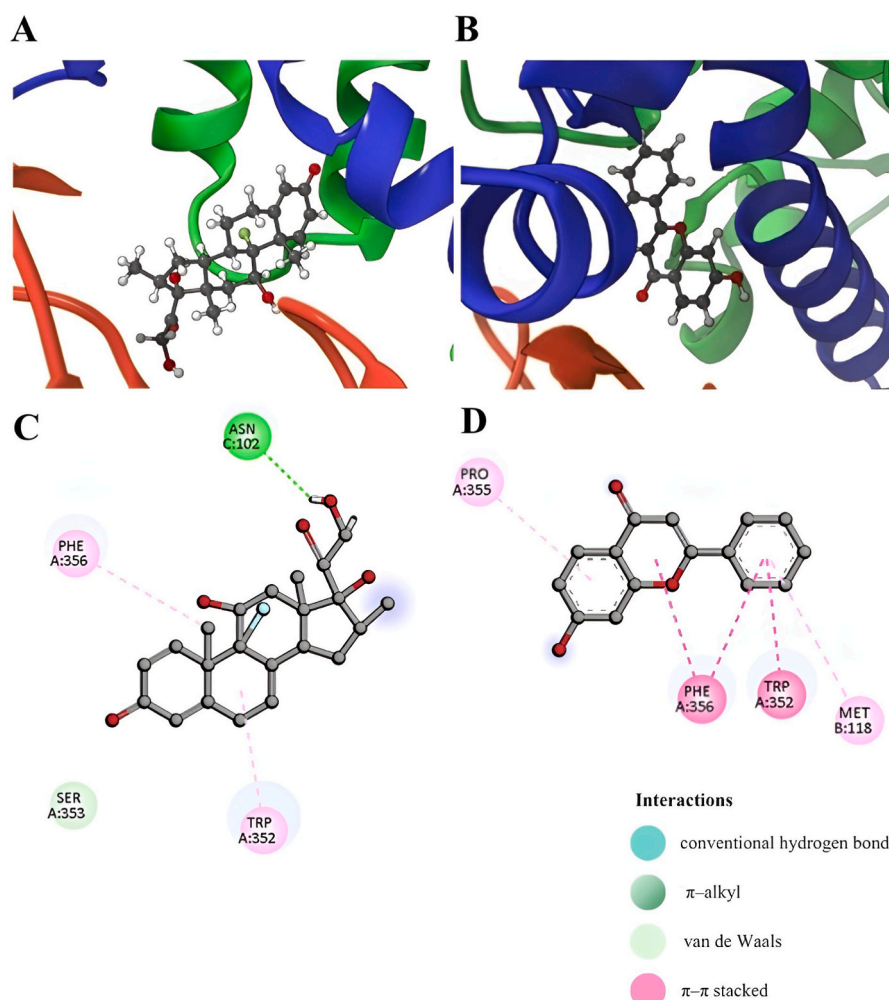


Fig. 5. Molecular docking of dexamethasone and 7HF into the calcineurin binding site (PDB ID: 1MF8). (A, C) Dexamethasone and (B, D) 7HF bound to calcineurin. Panels A and B show 3D representations of ligand–protein interactions, while panels C and D depict the corresponding 2D interaction maps.

arachidonic acid into prostaglandins, thereby potentially contributing to inflammatory signaling pathways [43]. Taken together, these findings indicate that concomitant administration of 7HF with substrates of CYP1A2 or CYP2C9 may warrant pharmacokinetic monitoring and, if necessary, dose adjustments to minimize the risk of drug–drug interactions.

Beyond CYP modulation, *in silico* analyses suggested that 7HF may interact with molecular targets involved in inflammatory and hormonal regulation, including AhR, AR-LBD, ER/ER-LBD, MMPs, and aromatase. Activation of AhR is classically associated with xenobiotic sensing and detoxification; however, sustained AhR signaling has been linked to increased oxidative stress and pro-inflammatory responses [44]. Likewise, AR-LBD and ER/ER-LBD play central roles in endocrine homeostasis and may influence hormone-dependent tumorigenesis, while MMPs contribute to extracellular matrix remodeling and the persistence of chronic inflammatory processes [45]. In addition, predicted activation of aromatase, an enzyme responsible for the conversion of androgens into estrogens, suggests a potential impact on hormonal balance, with possible implications for fertility and hormone-driven cancer risk. Collectively, these predictions point to a pleiotropic biological profile for 7HF and emphasize the importance of targeted experimental validation to clarify whether these interactions translate into therapeutically beneficial effects or represent potential safety concerns.

In vitro assays corroborated the *in silico* findings by confirming the absence of cytotoxic and hemolytic effects at concentrations up to 40 μ M. Preservation of membrane integrity distinguishes 7HF from several

other natural compounds known to induce nonspecific cytotoxicity and supports its suitability for pharmacological development [46,47]. Notably, 7HF selectively inhibited the proliferation of activated lymphocytes, while sparing unstimulated cells, reinforcing its classification as an immunomodulator rather than a general cytotoxic agent [48]. This behavior mirrors that of other immunoregulatory flavonoids, such as quercetin, luteolin, and apigenin ([49]; [50]).

Functionally, 7HF reduced PHA-induced lymphoproliferation in a concentration-dependent manner, with inhibition at the highest concentration surpassing that of dexamethasone. The partial reversal of this effect by the GR antagonist RU-486 indicates that GR engagement contributes to, but does not fully account for, the immunosuppressive activity of 7HF. This dual mechanism supports a model in which 7HF integrates GR-dependent and GR-independent pathways to achieve targeted immune regulation. Concomitant reductions in IL-2 and IFN- γ production further indicate suppression of Th1-type immune responses, consistent with the immunomodulatory profile of related flavonoids [14,51].

Gene expression analyses provided mechanistic insight into these functional effects. The pronounced downregulation of calcineurin subunits (PPP3CA, PPP3CB, and PPP3CC), together with reduced PLCG1 expression, supports inhibition of calcineurin-dependent NFAT dephosphorylation and nuclear translocation. Consequently, transcription of IL2, IL2RA, and IFNG was suppressed, reflecting diminished T-cell activation [23,52]. Modulation of calmodulin isoforms, characterized by increased CALM1 and CALM2 and decreased CALM3 expression,

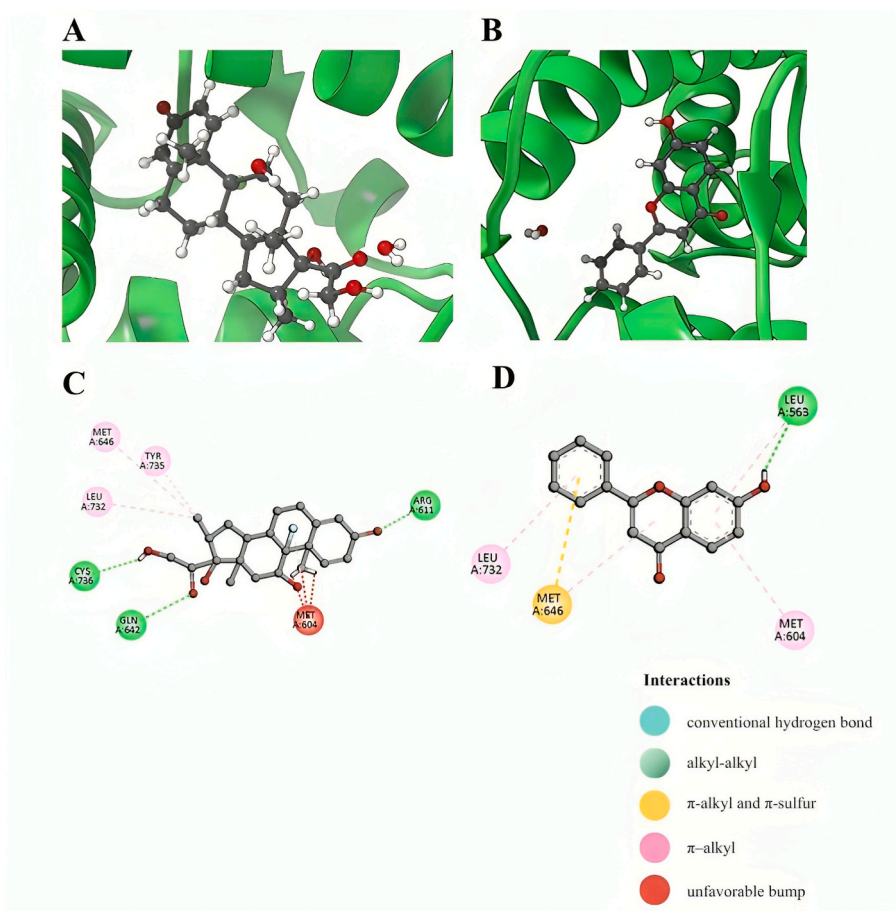


Fig. 6. Molecular docking of dexamethasone and 7HF into the glucocorticoid receptor (GR) binding site (PDB ID: 1NHZ). (A, C) Dexamethasone and (B, D) 7HF bound to the GR. Panels A and B show 3D representations of ligand–protein interactions, while panels C and D depict the corresponding 2D interaction maps.

suggests compensatory regulation of calcium signaling to preserve essential cellular functions while limiting excessive activation [53,54].

The compound 7HF also downregulated pro-inflammatory mediators (IL-6 and PTGS2/COX-2) and modulated GR-regulated genes (TSC22D3, FKBP5, DUSP1, and SGK1), indicating a selective feedback mechanism that prevents hyperactivation of GR signaling [55]. Moreover, modulation of PI3K/AKT components (\uparrow PIK3CA, \downarrow PIK3CB, and AKT2) [56] and suppression of transcription factors JUN, FOS, $\text{I}\kappa\text{B}$ - β , and STAT5a/STAT6 [34,57,58] support the idea that 7HF interferes with both Th1 and Th2 polarization pathways, consolidating its immunosuppressive selectivity.

Finally, molecular docking analyses supported the dual targeting of calcineurin and the glucocorticoid receptor by 7HF. ChemPLP scores indicated stable binding to both proteins, comparable to dexamethasone. Although 7HF exhibited slightly lower predicted affinity for GR, structural analysis revealed steric constraints in the dexamethasone–GR complex, suggesting that both ligands may achieve similar binding stability. These computational findings align with the functional and transcriptional data, supporting a model in which 7HF exerts immunomodulatory effects through integrated modulation of calcineurin/NFAT and GR signaling pathways.

In summary, our results identify 7HF as a safe and selective immunomodulatory flavone capable of suppressing lymphocyte activation through coordinated inhibition of calcineurin/NFAT, NF- κ B, and GR-associated pathways. Its favorable safety profile, combined with targeted molecular mechanisms, positions 7HF as a promising lead compound for the development of novel therapies for inflammatory and autoimmune diseases.

5. Conclusion

In conclusion, 7HF exhibits a favorable safety and pharmacological profile, supported by *in silico* and *in vitro* evidence. It preserves the viability of human PBMCs and murine splenocytes without inducing hemolysis, while selectively suppressing PHA-induced lymphocyte proliferation and reducing IL-2 and IFN- γ production. At the molecular level, 7HF inhibits calcineurin/NFAT signaling, downregulates inflammatory mediators (IFN- γ , IL-2, IL-6, and PTGS2), and modulates GR-regulated and PI3K/AKT-associated genes, indicating a selective immunosuppressive effect. Overall, 7HF emerges as a safe and mechanistically defined immunomodulatory flavonoid with potential as an immunomodulatory agent in preclinical models of autoimmune and chronic inflammatory diseases.

CRediT authorship contribution statement

Vanessa da Silva Oliveira: Writing – original draft, Methodology, Data curation, Conceptualization. **Dahara Keyse Carvalho Silva:** Writing – original draft, Methodology, Conceptualization. **Maria Vitória Gomes das Neves:** Investigation, Data curation. **Sergio Santos Silva Junior:** Investigation, Data curation. **Jônatas Sousa Pires dos Santos:** Investigation, Data curation. **Claudia Valeria Campos de Souza:** Writing – original draft, Investigation, Data curation. **José Maria Barbosa Filho:** Writing – original draft, Supervision, Conceptualization. **Oswaldo Andrade Santos-Filho:** Writing – review & editing, Supervision. **Milena Botelho Pereira Soares:** Writing – review & editing, Supervision, Conceptualization. **Cássio Santana Meira:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Conceptualization.

Funding

This work was supported by grants from FAPESB (PPP0027-2024). MBPS is recipient of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowship.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2026.111908>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- E. Patridge, P. Gareiss, M.S. Kinch, D. Hoyer, Analysis of FDA-approved drugs: natural products and derivatives, *Drug Discov. Today* 21 (2) (2016) 204–207.
- D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs, *J Nat Prod* 83 (3) (2020) 770–803, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- A.G. Atanasov, S.B. Zotchev, V.M. Dirsch, et al., Natural products in drug discovery: advances and opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (3) (2021) 200–216, <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
- N. CHAACHOUAY, L. ZIDANE, Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development, *Drugs and Drug Candidates* 3 (1) (2024) 184–207.
- A.N. Panche, A.D. Diwan, S.R. Chandra, Flavonoids: an overview, *J. Nutr. Sci.* 5 (2016) e47.
- L. Ciomârnean, M.V. Milaciu, O. Runcan, et al., The effects of flavonoids in cardiovascular diseases, *Molecules* 25 (18) (2020) 4320, <https://doi.org/10.3390/molecules25184320>.
- I. Górniak, R. Bartoszewski, J. Królczewski, Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids, *Phytochem. Rev.* 18 (1) (2019) 241–272, <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>.
- M.S. Al Aboody, S. Mickymaray, Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids, *Antibiotics (Basel)* 9 (2) (2020) 45, <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020045>.
- S. Lalani, C.L. Poh, Flavonoids as potential antiviral agents for enterovirus A71 infection, *Viruses* 12 (2) (2020) 184, <https://doi.org/10.3390/v12020184>.
- S. Kaushik, B. Bhushan, A. Kumar, et al., Genistein potentiates centchroman-induced antineoplasticity in breast cancer, *Life Sci.* 239 (2019) 117073, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117073>.
- M.C. Dias, D.C.G.A. Pinto, A.M.S. Silva, Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity, *Molecules* 26 (17) (2021) 5377, <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>.
- Y. Choi, 7,8-Dihydroxyflavone exhibits anti-inflammatory properties by downregulating the NF- κ B and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells, *Int. J. Mol. Med.* 29 (5) (2012) xxx-xxx.
- MARTÍNEZ, G.; MJARES, M. R.; DE SANCTIS, J. B. Effects of Flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, v. 13, n. 2, p. 84–104, 4 dez. 2019.
- Z. Jin, Q. Zhang, Y. Liu, et al., Inhibition of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells by 7-hydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone, *J. Pharm. Pharmacol.* 69 (7) (2017) 865–874, <https://doi.org/10.1111/jphp.12714>.
- N.F. Shamsudin, Q.U. Ahmed, S. Mahmood, et al., An updated review on flavones: structure, biosynthesis, mechanism of action, *Phytochem. Rev.* 21 (4) (2022) 1113–1145.
- C. Han, C. Zhang, Y. Ma, et al., 7-Hydroxyflavone alleviates neuroinflammation via inhibition of NLRP3 inflammasome and NF- κ B signaling, *Int. Immunopharmacol.* 108 (2022) 108891, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108891>.
- K. Jomova, D. Vondrakova, M. Lawson, et al., Flavonoids as antioxidants and potential therapeutics in inflammation-associated diseases, *Free Radic. Biol. Med.* 217 (2025) 1–20, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.09.010>.
- J.H. Lee, H.Y. Zhou, S.Y. Cho, et al., Vitexicarpin inhibits inflammatory mediator production, *Biol. Pharm. Bull.* 36 (5) (2013) 780–785, <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00933>.
- R. Pandey, R. Maurya, G. Singh, et al., Immunosuppressive properties of flavonoids from Boerhaavia diffusa, *Int. Immunopharmacol.* 5 (3) (2005) 541–553, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.10.014>.
- B.B. Mishra, V.K. Tiwari, D.D. Singh, et al., Immunomodulatory activity of flavonoids isolated from Boerhaavia diffusa, *Nat. Prod. Res.* 22 (15) (2008) 1345–1353, <https://doi.org/10.1080/14786410802186697>.
- J. Zhen, T.S. Villani, Y. Guo, et al., Luteolin suppresses inflammatory responses and attenuates lung injury, *Mol. Nutr. Food Res.* 61 (3) (2017) 1600436.
- K.R. Patil, U.B. Mahajan, B.S. Unger, et al., Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs, *Biomed. Pharmacother.* 86 (2016) 535–544, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.101>.
- D. Kempuraj, B. Madhappan, S. Christodoulou, et al., Flavonols inhibit inflammatory mediator release in human mast cells, *Br. J. Pharmacol.* 145 (7) (2005) 934–944, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706267>.
- TD Schmittgen, KJ Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat Protoc* 3 (6) (2008) 1101–1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>. PMID:18546601.
- S KIM, et al., PubChem 2025 update, *Nucleic Acids Research* 53 (D1) (2024).
- H.M. BERMAN, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research* 28 (1) (2000) 235–242.
- KAUPPI, B. et al. The Three-dimensional Structures of Antagonistic and Agonistic Forms of the Glucocorticoid Receptor Ligand-binding Domain. v. 278, n. 25, p. 22748–22754, 20 Jun. 2003.
- JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.
- KORB, O.; STÜTZLET.; EXNER, T. E., Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 1, p. 84–96, 2009.
- Anon, 2023" by "BIOVIA, 2021).Add in the final list of reference:BIOVIA, Dassault Systèmes 21.1.0. Discovery Studio Visualizer. Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2021.
- J.B. Calixto, M.M. Campos, M.F. Otuki, A.R. Santos, Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules, *Planta Med.* 70 (2) (2004) 93–103, <https://doi.org/10.1055/s-2004-815483>.
- J. Tao, Y. Wei, T. Hu, Flavonoids of Polygonum hydropiper attenuate LPS-induced inflammatory injury, *BMC Compl. Alternative Med.* 16 (2015) xxx-xxx.
- H.Y. Park, G.Y. Kim, J.W. Hyun, et al., 7,8-Dihydroxyflavone exhibits anti-inflammatory properties by downregulating the NF- κ B and MAPK signaling pathways in lipopolysaccharide-treated RAW264.7 cells, *Int. J. Mol. Med.* 29 (6) (2012) 1146–1152, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.935>.
- H.P. Kim, K.H. Son, H.W. Chang, S.S. Kang, Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms, *J. Pharmacol. Sci.* 96 (3) (2004) 229–245.
- S. Liga, C. Paul, F. Péter, Flavonoids: biosynthesis, biological activity, and extraction techniques, *Plants* 12 (14) (2023) 2732.
- R. Ginwala, R. Bhavsar, M. Nagarkatti, et al., Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on apigenin, *Antioxidants* 8 (2) (2019) 35.
- J.K. Kim, S.U. Park, Recent insights into the biological functions of apigenin, *Plants* 9 (1) (2020) 984–991.
- T. Vezza, A. Rodriguez-Nogales, F. Algieri, et al., Flavonoids in inflammatory bowel disease: a review, *Nutrients* 8 (4) (2016) 211.
- Y. Ranneh, F. Ali, M. Zarei, et al., Protective role of flavonoids in inflammatory diseases, *Molecules* 22 (7) (2017) 1148, <https://doi.org/10.3390/molecules22071148>.
- L.S. Bezerra, J.F. Lopes-Junior, E.S. Lima, et al., Impacts of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genetic polymorphism in tamoxifen therapy for breast cancer, *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 40 (12) (2018) 794–799, <https://doi.org/10.1055/s-0038-1675813>.
- B. Manoharam, R. Dhivya, V. Duraipandiyar, et al., Regulation of cytochrome P450 enzymes and oxidative stress by flavonoids, *Food Chem. Toxicol.* 185 (2024) 113633.
- C. Lenoir, V. Rollason, J. Desmeules, C.F. Samer, Influence of cytokines on cytochrome P450 activity, *Clin. Pharmacol. Ther.* 109 (1) (2021) 92–103, <https://doi.org/10.1002/cpt.1980>.
- L.M. De Jong, I.M. Ahout, T.M. van der Zanden, et al., Distinct effects of inflammation on cytochrome P450 regulation and drug metabolism, *Genes* 11 (12) (2020) 1509, <https://doi.org/10.3390/genes11121509>.
- J. Chen, H. Zhang, C. Li, et al., Chemical toxicity prediction based on semi-supervised learning and graph convolutional neural network, *J. Cheminf.* 13 (1) (2021) 93, <https://doi.org/10.1186/s13321-021-00548-3>.
- P. Banerjee, A.O. Eckert, A.K. Schrey, R. Preissner, ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals, *Nucleic Acids Res.* 46 (W1) (2018) W257–W263, <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>.
- E.B. Lugli, J.J. Correia, M.L. Bianchi, et al., Hemolytic activity, and cytotoxicity of natural compounds, *Phytother. Res.* 22 (10) (2008) 1403–1408, <https://doi.org/10.1002/ptr.2472>.
- C. Figueredo, R.S. Ferreira, M. Oliveira, et al., Himatanthus drasticus leaves: chemical characterization and evaluation of antimicrobial, antibiofilm, antiproliferative activities, *Molecules* 22 (6) (2017) 910, <https://doi.org/10.3390/molecules22060910>.
- M. Matsuo, N. Sasaki, K. Saga, T. Kaneko, Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2) (2005) 253–259, <https://doi.org/10.1248/bpb.28.253>.
- M.P. Nair, S. Mahajan, J.L. Reynolds, et al., The flavonoid quercetin inhibits TNF- α gene expression via NF- κ B, *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (3) (2006) 319–328, <https://doi.org/10.1128/CVI.13.3.319-328.2006>.
- A. HOSSEINZADE, et al., Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity, *Frontiers in Immunology* 10 (2019) 31.

- [51] J. Song, H.R. Park, Y.J. Kim, et al., Immunomodulatory effects of flavonoids on Th1/Th2 balance, *Front. Immunol.* 14 (2023) 1149272, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1149272>.
- [52] J. Yang, Y. Wei, Z. Yu, et al., The calcineurin-NFAT pathway in T-cell activation and autoimmune disease, *Front. Immunol.* 10 (2019) 2760.
- [53] M. Ontiveros, G.E. Aranda-Abreu, J.A. de la Cruz-Vargas, et al., Role of calmodulin in immune cell activation, *Immunol. Lett.* 212 (2019) 10–19, <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.06.002>.
- [54] A. Crivici, M. Ikura, Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24 (1995) 85–116, <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.24.060195.000505>.
- [55] G. Wei, Y. Guan, Y. Yin, et al., Glucocorticoid receptor, and co-regulators in inflammation, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (20) (2016) 3843–3858.
- [56] T.A. Zughaihi, Z.M. Mohammedsleh, M.A. Al-Omar, et al., Flavonoid modulation of PI3K/AKT signaling in inflammation and cancer, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 689802, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.689802>.
- [57] J.R. Cortes, M. Perez-G, M.D. Rivas, et al., Kaempferol inhibits IL-4-induced STAT6 activation by specifically targeting JAK3, *J. Immunol.* 179 (6) (2007) 3881–3887, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3881>.
- [58] Y. Yin, L. Zhang, J. Li, et al., Targeting STAT signaling pathways in autoimmune diseases, *Pharmacol. Ther.* 220 (2021) 107724.