



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

LAÍSIA FALCÃO ALONSO UZÊDA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA
CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-
ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA EM MACRÓFAGOS
E LINFÓCITOS MURINOS

SALVADOR

2024

LAÍSIA FALCÃO ALONSO UZÊDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA
CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-
BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA
EM MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS MURINOS**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade Estadual da Bahia (UNEB), como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

Linha de Pesquisa 01: Prospecção de Fármacos

SALVADOR

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Professor Edivaldo Machado Boaventura - UNEB – Campus I

Uzêda, Laísia Falcão Alonso

Título da dissertação: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA EM MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS MURINOS / Laísia Falcão Alonso Uzêda– Salvador, 2024.

112 f.

Orientador: Elisalva Teixeira Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, 2024.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA EM MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS MURINOS

LAÍSIA FALCÃO ALONSO UZÊDA

Linha de Pesquisa: (Número 01) – Nome da Linha (Prospecção de Fármacos)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), em 26 de julho de 2024, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB), conforme avaliação da Banca Examinadora:

Professor(a) Dr(a). Elisalva Teixeira Guimarães (Orientador)

Instituição de atuação: Universidade do Estado da Bahia–UNEB

Doutorado em Patologia

Instituição que obteve o título de Doutor: Universidade Federal da Bahia – UFBA/
Fundação Oswaldo Cruz/BA

Professor(a) Dr(a). Acássia Benjamim Leal Pires (Membro Interno – PPGFARMA/UNEB)

Instituição de atuação: Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Doutorado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética de Microorganismos
Instituição que obteve o título de Doutor: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Professor(a) Dr(a). Juliana Fraga Vasconcelos (Membro Externo)

Instituição de atuação: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP

Doutorado em Biotecnologia

Instituição que obteve o título de Doutor: Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS/
Fundação Oswaldo Cruz/BA

DEDICATÓRIA

Ao meu pai que sempre me apoiou na pesquisa
e incentivou a seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus pais, por sempre me mostrar desde pequena que quando se batalha e corre atrás dos seus sonhos eles podem se tornar realidade. Obrigada, por sempre estarem ao meu lado no momentos bons e ruins, e dividir comigo suas histórias e conhecimentos.

Aos meus amigos, em especial Sara, Laise, Catarina e Beatriz por sempre estarem comigo, e me ajudarem em tudo, absolutamente tudo, desde construção de um gráfico, ao cafezinho para rimos e choramos dos experimentos que deram errados. Obrigada, eu amo vocês!

A minha Orientadora Doutora Elisalva Guimarães, que desde a graduação nosso relacionamento sempre foi bom, sempre me dando puxão de orelha quando necessário, e mostrando o meu potencial dentro da ciência, e me incentivando a fazer pesquisa, sempre com muita calma, gentileza e carinho, mesmo quando tudo estava dando errado. Obrigada liu/prof/ori por compartilhar seus vasto HD de conhecimentos comigo e com todos do nosso grupo, e por ter ensinado, mesmo que indiretamente, que com gentileza, amor e carinho conseguimos tudo.

Gratidão a todos os funcionários e professores do PPGFARMA, em especial a Léia pela gentileza e compressão, e paciência em responder todas as minhas mensagens em final de expediente. Gostaria de agradecer também ao PPGFARMA e a CAPES, pela oportunidade de bolsa durante o desenvolvimento do meu mestrado.

Agradeço a todos da equipe LETI/FIOCRUZ/CIMATEC, em especial, a Dra. Milena Botelho pela grandiosa oportunidade de desenvolver os experimentos no LETI e no CIMATEC. Ao grupo GEPPE, por toda ajuda e risadas dadas durante os experimentos, trabalhar com você é sempre incrível.

O essencial é invisível aos olhos

RESUMO

Introdução: O sistema imunológico desempenha um papel fundamental na homeostase do organismo e alterações em seu funcionamento podem resultar em doenças imunomediadas. O tratamento para essas doenças está frequentemente associado a efeitos adversos. As altas dosagens utilizadas, a duração do tratamento e a possibilidade de infecção por patógenos oportunistas dificultam a adesão dos pacientes à terapia medicamentosa. Diante disso, a busca por novos fármacos com ação imunomoduladora mais eficaz e com menor efeito colateral torna-se necessária. **Objetivos:** Avaliar o potencial imunomodulador da chalcona (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA (FERAI) em macrófagos e linfócitos murinos ativados *in vitro* e em modelo experimental *in vivo* de edema de pata. **Materiais e Métodos:** O FERAI foi sintetizado no Laboratório de Química Orgânica da UFPB e gentilmente cedido ao nosso grupo de pesquisa para o desenvolvimento dos ensaios. A citotoxicidade do composto foi avaliada em macrófagos murinos pelo método do AlamarBlue. As dosagens de citocinas pró e anti-inflamatórias em macrófagos e em linfócitos ativados após tratamento com FERAI foram realizadas por ELISA. A influência do FERAI em inibir a proliferação de linfócitos também foi avaliada. O tamanho da lesão e o infiltrado inflamatório em modelo murino de edema da pata induzido por carragenina foram analisados após o tratamento com FERAI. **Resultados:** O FERAI apresentou baixa citotoxicidade ($CC_{50} = 66 \pm 0,12 \mu\text{M}$) e reduziu a produção das citocinas pró-inflamatórias de macrófagos (IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α) e de linfócitos (IL-2 e IFN- γ) após 24 e/ou 48 horas de tratamento, quando comparadas as células apenas estimuladas e não tratadas. Além disso, foi observada uma redução significativa na produção de IL-10 por macrófagos em todas as concentrações e tempos testados. O FERAI também reduziu o edema de pata e o infiltrado inflamatório em camundongos BALB/c. **Conclusão:** Nossos resultados indicam que o FERAI é um agente farmacológico promissor para estudos em doenças imunomediadas.

Palavras-chave: Macrófagos, Linfócitos, Chalconas, Imunomodulação, Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: The immune system plays a crucial role in the body's homeostasis, and disturbances in its function can result in immune-mediated diseases. Treatment for these diseases is often associated with severe side effects. The high dosages used, length of the treatment, and potential for opportunistic pathogen infections make it challenging for patients to adhere to drug therapy. Therefore, the search for new drugs with a more effective immunomodulatory action and fewer side effects becomes necessary.

Objectives: To evaluate the immunomodulatory potential of chalcone (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-YL)-3-(3-BROMO-4-ETHOXY-

5METHOXYPHENYL)PROP-2-EN-1-ONE (FERAI) in activated murine macrophages and lymphocytes *in vitro* and *in vivo* experimental model of paw edema. **Materials and**

Methods: FERAI was synthesized in the Organic Chemistry Laboratory of UFPB and kindly provided to our research group for development of the essays. Compounds cytotoxicity was assessed in murine macrophages using AlamarBlue method. Dosages of pro and anti-inflammatory cytokines in activated macrophages and lymphocytes after treatment with FERAI were done by ELISA. FERAI's influence in inhibiting proliferation of lymphocytes was also assessed. The lesions size and inflammatory infiltrate in murine model of paw edema induced by carrageenan were analyzed after treatment with FERAI.

Results: FERAI presented low cytotoxicity ($CC_{50} = 66 \pm 0.12 \mu\text{M}$) and reduced the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages (IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α) and lymphocytes (IL-2 and IFN- γ) after 24 or 48 hours of treatment, when compared to the negative control. As expected, macrophages stimulated with LPS and treated with dexamethasone also decreased the production of these cytokines and NO. Additionally, FERAI significantly reduced the production of IL-10 at all tested concentrations. Moreover, FERAI inhibited lymphocyte proliferation in a concentration-dependent fashion. FERAI was able to reduce paw edema and inflammatory infiltrate in BALB/c mice. **Final Considerations:** The results suggest that FERAI modulates the production of nitric oxide and cytokines by macrophages, reduces lymphocyte proliferation *in vitro* and reduce the inflammatory infiltrate in a murine model of paw edema.

Keywords: Macrophages, Chalcones, Immunomodulation, Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ANOVA	Análise de variância
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CD	Conjunto de diferenciação (do inglês: <i>Cluster of differentiation</i>)
cDNA	DNA complementar (do inglês: <i>Complementar deoxyribonucleic acid</i>)
CI ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo a cAMP (do inglês: <i>cAMP Response Element Binding Protein</i>)
DCV	Departamento de Ciências da Vida
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FERAI	Chalcona (E)-1-benzo[d] [1,3] dioxol-5-il)-3-(3bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IFN- γ	Interferon gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina

LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
LPS	Lipopolissacarídeo
min.	Minuto
mL	Mililitros
mm ³	Milímetro cúbico
Nº	Número
NF	Fator nuclear (do inglês: <i>Nuclear factor</i>)
nM	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico (do inglês: <i>Nitric oxide</i>)
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato (do inglês: <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma (do inglês: <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>)
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão (do inglês: <i>Pattern Recognition Receptors</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (do inglês: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (do inglês: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
TLR	Receptores do tipo Toll (do inglês: <i>Toll-like receptors</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>Tumor Necrosis Fator alpha</i>)

UNEB

Universidade do Estado da Bahia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representações estruturais e numéricas da chalcona;

Figura 2: Estrutura química da chalcona (E)-1-benzo[d][1,3] dioxol-5-il)-3-(3bromo-4-etoxi-5- metoxifenil) prop-2-en-1-ona (FERAI);

Figura 3: Produção de citocinas e nitrito por macrófagos ativados após tratamento ou não com o FERAI.

Figura 4: Inibição da proliferação de linfócitos pelo FERAI.

Figura 5: Modulação da função dos linfócitos pelo FERAI.

Figura 6: FERAI diminui o edema de pata induzido por carragenina.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Avaliação da citotoxicidade de FERAI em macrófagos da linhagem J774-G8.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1.	Objetivo Geral.....	18
2.2.	Objetivos Específicos.....	18
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1.	A resposta imune e doenças imunomediadas.....	19
3.2.	O papel das citocinas na resposta imune.....	21
3.3.	Tratamento de doenças imunomediadas.....	23
3.4.	Chalconas.....	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1.	Moléculas.....	28
4.2.	Obtenção de Macrófagos.....	28
4.3.	Obtenção de Linfócitos.....	29
4.4.	Avaliação da Citotoxicidade.....	29
4.5.	Dosagem de nitrito e citocinas.....	29
4.6.	Linfoproliferação.....	30
4.7.	Edema de pata e Análise Histopatológica.....	30
4.8.	Análise estatística.....	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1.	FERAI apresenta baixa citotoxicidade.....	32
5.2.	FERAI inibe a produção de citocinas e de nitrito por macrófagos ativados.....	33

5.3. FERAI inibe a linfoproliferação e produção de citocinas em linfócitos murinos ativados.....	35
5.4. FERAI diminui o edema de pata induzido por carragenina	37
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS.....	53

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico desempenha funções essenciais para o organismo na manutenção da homeostase, na defesa contra patógenos e na eliminação de tecidos danificados e células apoptóticas ou senescentes (Ginhoux; Jung, 2014; Yatim; Lakkis, 2015). Doenças como lúpus, esclerose múltipla, diabetes tipo 1, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e aterosclerose são exemplos de condições ocasionadas por alterações na resposta imune (Goronzy; Weyand, 2005; Koelwyn *et al.*, 2018; Russo; Lumeng, 2018; Kiriakidou; Ching, 2020).

A terapia medicamentosa para doenças imunomediadas é direcionada principalmente para a redução da inflamação excessiva e alívio dos sintomas. No entanto, a adesão dos pacientes ao tratamento pode ser complicada devido aos graves efeitos colaterais, altas dosagens e a longa duração do tratamento (Bullock *et al.*, 2019). O tratamento de primeira linha inclui anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os corticoides. O acetilsalicilato, por exemplo, é um AINES eficaz no tratamento de artrite reumatoide, agindo pela inibição da ciclooxigenase e, conseqüentemente, na produção de prostaglandinas. Já os corticoides, como a dexametasona, apresentam maior potência, mas o seu uso prolongado pode tornar o indivíduo suscetível a infecções por patógenos oportunistas (Okon; Werth, 2009; da Silva *et al.*, 2013).

Diante desses desafios, a busca por alternativas terapêuticas é constante. As chalconas e seus derivados, pertencentes à classe dos flavonoides, têm ganhado destaque nos últimos anos devido ao seu amplo espectro de aplicações, suas propriedades químicas e biológicas, bem como pela sua versatilidade estrutural (Jasim *et al.*, 2021). As chalconas são constituintes fundamentais de várias plantas medicinais e comestíveis. Extraídas de plantas como alcaçuz, maçãs, tomates e raiz de dedo, as chalconas têm ganhado atenção devido ao seu amplo espectro de aplicações e propriedades químicas e biológicas (Jasim *et al.*, 2021). Estas substâncias são caracterizadas quimicamente por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia alifática de três carbonos (Li; Lo; Ho, 2006; Iijima *et al.*, 2008; Gosch *et al.*, 2009; Slimestad; Verheul, 2011; Gomes *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado que os derivados das chalconas apresentam atividades farmacológicas e biológicas de interesse, com ação antioxidante (Ghribia *et al.*, 2014), anti-inflamatória (Lin *et al.*, 2009), antiparasitária (Rodrigues *et al.*, 2016), antimicrobiana (Zampini; Vattuone; Isla, 2005), antiviral (Uchiumi *et al.*, 2003) e antitumoral (Sumiyoshi *et al.*, 2015).

Este amplo espectro de ações biológicas em conjunto com a versatilidade desta classe de moléculas, direciona a obtenção de novas estruturas químicas de chalconas e reforça a necessidade do desenvolvimento de tratamentos alternativos menos tóxicos e mais acessíveis aos portadores de diferentes doenças que afetam o sistema imunológico (Hussain e Ali, 2017). O nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a avaliação da atividade antiparasitária e imunomoduladora de chalconas e seus derivados. Estudos preditivos *in silico* sugerem uma possível atividade imunomoduladora da bromo-chalcona (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (FERAI). Neste contexto, este trabalho visa investigar o potencial imunomodulador da chalcona FERAI em macrófagos e linfócitos murinos e o seu potencial anti-inflamatório em modelo experimental de edema de pata.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial imunomodulador do FERAI em macrófagos e linfócitos ativados *in vitro* e em modelo murino de edema de pata.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade do FERAI;
- Avaliar o perfil da produção de citocinas e de óxido nítrico após o tratamento de macrófagos murinos com FERAI;
- Investigar a influência do FERAI na proliferação de linfócitos e no perfil de produção de citocinas por estas células;
- Verificar o potencial do FERAI em modular a resposta inflamatória em modelo murino de edema de pata.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. A RESPOSTA IMUNE E DOENÇAS IMUNOMEDIADAS

A resposta imune é o processo de defesa do corpo contra estímulos exógenos e endógenos, como infecções e lesões teciduais, que resultam em processo inflamatório e reparação tecidual (Loza *et al.*, 2007). A resposta imune pode ser classicamente dividida em imunidade inata e adaptativa, sendo a imunidade inata mais inespecífica e a primeira a ser ativada, e tem como principal célula o neutrófilo. Os neutrófilos migram para o tecido danificado e fagocitam o patógeno com o objetivo de cessar o estímulo nocivo. Por outro lado, na imunidade adaptativa, a resposta é mais lenta e as células principais são os macrófagos e os linfócitos T e B. Essas células formam uma resposta mais específica, pois apresentam a plasticidade de adaptação na secreção de citocinas e anticorpos contra um determinado patógeno (Netea *et al.*, 2019).

No âmbito das respostas imunes, existe o sistema fagocitário mononuclear, que deriva de células-tronco hematopoiéticas localizadas na medula óssea (Murray; Wynn, 2011; Italiani; Boraschi, 2014). Este sistema inclui as células fagocíticas profissionais - monócitos, macrófagos e células dendríticas - que se diferenciam das não profissionais por expressarem receptores na sua superfície, como os receptores do tipo Toll (TLRs) e os de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem mecanismos de sinalização de tecidos não saudáveis. Os macrófagos são as principais células apresentadoras de antígeno, após fagocitar o patógeno, ele apresenta peptídeos através do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe 2 aos linfócitos ativando-os (Murray; Wynn, 2011).

Os monócitos são células efetoras que possuem receptores de quimiocinas e PRRs responsáveis pela migração destes tipos celulares do sangue para os tecidos, os quais se diferenciam em macrófagos (Guilliams; Mildner; Yona, 2018). Os macrófagos, células plásticas capazes de transitar entre diferentes fenótipos, têm a sua polarização definida em função do microambiente e da sinalização dos tecidos. São subclassificados pelos receptores que expressam na superfície celular, pela produção de citocinas e pela sua atividade, em duas categorias principais: a de ativação clássica (M1) e ativação alternativa (M2). Na ativação clássica, os macrófagos são caracterizados por produzir citocinas pró-inflamatórias e capacidade de eliminar patógenos intracelulares. Em contrapartida, a remodelação tecidual, controle de infecções por parasitos e fungos extracelulares pode ser observada via M2 (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Yao; Xu; Jin, 2019).

Neste contexto, diversos estudos estabeleceram uma correlação entre a presença de monócitos, que expressam marcadores semelhantes aos macrófagos M1 no sangue periférico e a gravidade do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) na infância. O LES é uma doença autoimune que pode afetar as articulações, a pele, os rins, as células sanguíneas, o cérebro, o coração e os pulmões. Já foi evidenciado que citocinas pró-inflamatórias, características dos macrófagos M1, possuem um papel pró-aterosclerótico, capaz de agravar quadros clínicos de pacientes com aterosclerose induzidas por LES (Ahamada; Jia; Wu, 2021).

Os monócitos e macrófagos têm um papel crucial no desenvolvimento da aterosclerose. A aterosclerose é uma doença na qual há depósito de lipídios na parede de vasos, especialmente em artérias. Essa interação se dá quando os monócitos circulantes são recrutados e diferenciados em macrófagos teciduais, dando início à captação do colesterol e à formação da placa aterosclerótica (Fuster *et al.*, 2010; Swirski; Nahrendorf, 2013). Nesse processo, as células M1 impulsionam a instabilidade da placa, a proliferação de células musculares lisas e a produção de moléculas vasoativas, como o óxido nítrico (NO), endotelinas e eicosanoides. Esses fatores acarretam a oxidação de lipoproteínas e a citotoxicidade. Em contrapartida, os macrófagos M2, que expressam CD36, favorecem a captação de lipoproteínas de baixa densidade oxidada e a secreção de TGF- β , inibindo o recrutamento de células inflamatórias. Esses mecanismos estão associados ao reparo tecidual, à estabilidade da placa e à proteção contra a aterosclerose (Liu *et al.*, 2014; Barrett, 2020).

Uma outra ação de macrófagos é atuar como células apresentadoras de antígenos e contribuir para a indução da resposta imune adaptativa, por meio da apresentação de antígenos não próprios e da liberação de citocinas que são capazes de ativar ou inibir os linfócitos T e B (Lee; Bukhari; Fauzi, 2015). Os linfócitos T expressam as moléculas CD4 e CD8, e desempenham funções diferentes de acordo com a molécula que expressam (Mousset *et al.*, 2019).

Os linfócitos T CD4+ são células auxiliares e desempenham o papel de secretar citocinas que auxiliam os macrófagos a destruírem os patógenos fagocitados. Além disso, as células B são ativadas pelos linfócitos T CD4+. Essa ativação ocorre nos centros germinativos dos órgãos linfoides secundários, onde os linfócitos T liberam citocinas e co-estimulam as células B por meio do ligante CD40 (CD40L), orientando a resposta imune. Por outro lado, os linfócitos T CD8+ são as células citotóxicas, que atuam na eliminação de células infectadas e tumorais por meio da liberação de citocinas (Reina-Campos; Scharping; Goldrath, 2021).

Um estudo de bioinformática revelou que as células infiltradas mais frequentes no desenvolvimento da artrite reumatoide são os macrófagos M1 e M2, as células T CD8+, os linfócitos B virgens e as células T foliculares auxiliares (Tfh). As Tfh, que são um subtipo de células T CD4+, expressam moléculas como CXCR5, ICOS e PD1. Tais expressões estão associadas e regulam a produção de anticorpos pelos linfócitos B (Zhou; Lu; Xiong, 2021). Durante a patogênese da artrite reumatoide, ocorrem duas principais alterações na membrana do tecido sinovial. Na primeira delas, na região da íntima, há um aumento numérico e de atividade dos macrófagos sinoviais (MSs) e dos fibroblastos sinoviais (FSs). Ambos produzem citocinas e proteases. Os MSs, atuando como macrófagos M1, secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Já os FSs, além de secretarem citocinas, interagem com as células da resposta imune, potencializando a formação de uma estrutura linfoide ectópica na região. Estas células também secretam metaloproteinasas de matriz, prostaglandinas e leucotrienos (Jang; Kwon; Lee, 2022). A segunda alteração é marcada pela infiltração celular na região da cartilagem-osso, resultando na liberação e formação de exsudato inflamatório. Este exsudato, também conhecido como "pannus", pode ser composto por macrófagos, FSs, CDs e mastócitos. A longo prazo, essas células podem causar erosão da região óssea (Jang; Kwon; Lee, 2022).

As células B exibem uma diversidade de receptores, o que lhes permite responder a uma vasta gama de antígenos. A ligação de antígenos a estes receptores induz a mobilização de cálcio e a fosforilação de proteínas intracelulares (Kwak; Akkaya; Pierce, 2019). As células B têm um papel fundamental no desenvolvimento de doenças autoimunes, sendo que um aumento na sua sobrevivência é um dos fatores que contribui para a perda de tolerância imunológica. O fator de ativação de células B (BAFF) é crucial para a sobrevivência dessas células. Notavelmente, estudos demonstraram que indivíduos com artrite reumatoide, LES e síndrome de Sjögren apresentam níveis séricos elevados dessa proteína (Pers *et al.*, 2005; Rochas *et al.*, 2009; Youinou; Saraux; Pers, 2012). No contexto do LES em estágio ativo, observa-se a superativação das células B, juntamente com a diminuição da expressão de genes pró-apoptóticos e aumento de genes pró-sobrevivência (Fauci; Moutsopoulos, 1981). Além disso, em doenças como a artrite reumatoide e a diabetes tipo 1, as células B são responsáveis pela produção de autoanticorpos e pela apresentação de antígenos (Lee; Rojas; Gommerman, 2021).

3.2. O PAPEL DAS CITOCINAS NA RESPOSTA IMUNE

As citocinas são mediadoras da inflamação e das respostas imunes, capazes de estimular precursores na medula óssea a produzirem mais leucócitos (Roe, 2021). Os macrófagos ativados produzem diversas citocinas, inclusive o TNF- α e a IL-1 β . Durante a inflamação aguda, a principal função dessas citocinas é a ativação endotelial. Elas estimulam a expressão de moléculas aderentes, aumentando o recrutamento leucocitário para o local da inflamação. Ao chegarem à corrente sanguínea, essas citocinas podem ter efeito sistêmico, como febre e redução da pressão (Jang *et al.*, 2021; Roe, 2021; Broderick; Hoffman, 2022).

O TNF- α se liga a dois principais receptores, tipo 1 e tipo 2 (TNFR1 e TNFR2, respectivamente). A ativação do TNFR1 desencadeia a formação de diferentes complexos de sinalização, os quais induzem a inflamação, a apoptose, a necrose e a defesa imune contra patógenos (Brenner; Blaser; Mak, 2015). Em contrapartida, a ativação do TNFR2 pode mediar a regeneração tecidual, a proliferação, a migração e a sobrevivência celular (Probert, 2015). A IL-1 β exerce a função inflamatória ao se ligar ao seu receptor 1 (IL-1R1) na mesma célula ou em células adjacentes, ativando vias de sinalização intracelular, o que leva à maior produção de citocinas pró-inflamatórias e proteínas do inflamassoma, amplificando a inflamação no local (Broderick; Hoffman, 2022).

Essas duas citocinas são estímulos para a produção de outra, a IL-6. Esta citocina, a depender do estímulo, tem ação pró-inflamatória e está envolvida com a senescência celular, principalmente pela via de transcrição 3 (STAT3), o que leva à sobrevivência celular e à secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (Hirano *et al.*, 1987). Outro papel importante da IL-6 é a imunomodulação de macrófagos para o perfil alternativo (M2) (Martinez; Helming; Gordon, 2009) e de linfócito T auxiliares do tipo 2 (Th2), resultando na maior progressão de células tumorais e de doenças parasitárias (Rincón *et al.*, 1997).

Os macrófagos M2 e os linfócitos T são as principais fontes celulares da IL-10. A IL-10 tem função de imunossupressão de macrófagos, por meio da inibição da produção de citocinas, do MHCII e de moléculas de adesão. Isso impede o recrutamento de novas células ao local da inflamação, além da apresentação de antígenos, diminuindo a eficiência da ativação de linfócitos T. Esta citocina também impede a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados (Saraiva *et al.*, 2020). A IL-10 interfere na diferenciação de linfócitos T CD4+ ao inibir a produção de citocinas como IL-12 e IL-23, ao mesmo tempo que aumenta a proliferação e atividade citotóxica de células CD8+, a sobrevivência de células B e mudança nos isótopos de anticorpos (Wang *et al.*, 2019).

As citocinas IL-12 e IL-23 fazem parte da família das IL-12, essas duas citocinas agem no sistema imune promovendo a proliferação de células Th1 e Th17. A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, produzida por macrófagos e linfócitos T e B. A produção de interferon gama (INF- γ) estimula a produção de IL-12 (Vignali; Kuchroo, 2012). Ela atua diretamente na diferenciação das células Th1, agindo também como antagonista limitador de células Th2 inibindo a produção de IL-4 (Wills-Karp, 2001).

O interferon gama (INF- γ), ou do tipo 2, é uma citocina produzida, principalmente, por linfócitos T CD4+ e CD8+. A produção dessa citocina pode ocorrer de duas maneiras, através de estímulos de outras citocinas como o TNF α e a IL-12, ou através da sinalização dos PRRs durante uma infecção (Hu; Ivashkiv, 2009). Essa citocina é sinalizada através do receptor INF- γ (INF- γ R) que pode ser expresso em quase todos os tipos de células, tendo os macrófagos como os principais alvos. A ligação ao seu receptor ativa a via STAT (Hu; Ivashkiv, 2009; Villarino; Kanno; O'Shea, 2017).

Os macrófagos ativados por INF- γ são os M1, hiper-responsivos a estímulos de citocinas pró-inflamatórias e resistentes a IL-10, IL-4 e glicocorticoides. Nos linfócitos, o INF- γ promove a diferenciação no perfil Th1, induz as células Tregs e suprime as células Th2 e Th17, além de promover a mudança de isotipo de anticorpos em linfócitos B (Hu; Ivashkiv, 2009). O INF- γ atua também na remodelação tecidual, suprimindo a resposta fibrótica e a angiogênese, através da inibição da IL-4, do TGF- β e do VEGF (Tabas; Lichtman, 2017).

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória produzida por linfócitos Th2. A IL-4 estimula a diferenciação de macrófagos M2, a proliferação das células B e a mudança do isotipo de anticorpos para IgE, a ativação e degranulação de basófilos e mastócitos. Ela também está envolvida na produção de colágeno por fibroblastos (Iwazsko; Biały; Bogunia-Kubik, 2021).

3.3. TRATAMENTO DE DOENÇAS IMUNOMEDIADAS

A terapia medicamentosa para as doenças imunomediadas tem como objetivo principal reduzir a inflamação excessiva, alívio dos sintomas e do desconforto causado pela doença. Apesar do grande arsenal de fármacos disponíveis para o tratamento destas doenças, os efeitos colaterais graves, as doses elevadas utilizadas e o tempo de duração dificultam a adesão dos pacientes a terapia medicamentosa (Bullock *et al.*, 2019).

O tratamento de entrada são os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) e os corticoides. O acetilsalicilato é um AINES altamente eficaz quando utilizado em altas doses no tratamento de artrite reumatoide (AR), por exemplo. Ele atua inibindo o acesso do ácido araquidônico, o qual é substrato aos canais hidrofóbicos das enzimas ciclooxigenase/prostaglandina-endoperóxido sintase (PGHS) 1 e 2. Essas enzimas catalisam os eicosanoides, dentro deles estão as prostaglandinas (PG), os tromboxanos e os leucotrienos. A PGHS2 catalisa a produção de PGE₂ em células imunes, fibroblastos e células endoteliais (Zarghi; Arfaei, 2011). c (Bullock *et al.*, 2019).

Os corticoides ou glicocorticoides, como a dexametasona, a prednisona e a cortisona, por sua vez, são mais potentes que os AINES. Sua administração pode ser realizada via oral ou injetável. Esses hormônios assemelham-se ao AINES na atividade de inibição de PGE₂. Além disso, os corticoides atuam na diferenciação de células apresentadoras de antígenos diminuindo a ativação de linfócitos T e de fatores de transcrição dos receptores de linfócitos T e B (Cain; Cidlowski, 2017). O seu uso deve ser limitado a um curto período e a baixas doses, com risco de uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecções por patógenos oportunistas após período de uso prolongado devido à sua ação no metabolismo de carboidratos, gorduras, proteínas e imunossupressão. Seus efeitos colaterais incluem osteoporose; supressão do eixo hipófise-adrenal, ganho de peso, hiperglicemia/diabetes, dislipidemia, imunossupressão (Liu *et al.*, 2013).

Quanto ao tratamento de segunda linha dos corticoides e AINES, os medicamentos possuem ação mais lenta, podendo levar de semanas a meses para surtir efeito. O metotrexato (MTX) é um exemplo. Trata-se de um análogo do ácido fólico que inibe a conversão do ácido diidrofólico em ácido folínico, ao ligar-se à enzima conversora, e conseqüentemente, inibe o metabolismo da purina e da pirimidina. Estudos demonstraram que o MTX age principalmente como um imunossupressor da linfoproliferação, reduzindo o recrutamento leucocitário para a região inflamada. Os efeitos colaterais mais significativos do MTX incluem hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, sendo necessários exames laboratoriais constantes para monitoramento (Kuhn; Ruland; Bonsmann, 2011).

A hidroxicloroquina, um antimalárico, pode também ser usado no tratamento de doenças do sistema imunológico. Estudos demonstraram que o uso deste medicamento causa a diminuição da secreção de citocinas pro-inflamatórias advindas de monócitos, porém o seu uso pode causar problemas no trato gastrointestinal, no sistema nervoso central e amarelamento da pele, sendo

aconselhado consultas rotineiras com oftalmologistas, se administrado em altas doses (da Silva *et al.*, 2013).

Outro tratamento que vem ganhando destaque nos últimos anos é o uso de agentes biológicos e muitos desses medicamentos estão na fase de estudo clínico. Inibidores de TNF (TNFi), por exemplo, são anticorpos IgG1 que inibem o recrutamento celular, diminuem a inflamação e alivia os sintomas. Seu mecanismo de ação ainda está em fase de estudo e o seu uso é geralmente em combinação com outros medicamentos como o MTX. Alguns pacientes interrompem o seu uso devido ao aumento do risco de infecção, alterações hematológicas e distúrbios neurológicos (Atiqi *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2020). Inibidores de IL também fazem parte dessa classe de medicamentos. O antagonista do receptor de IL-1, comercialmente conhecido como Anakira, atua bloqueando a sinalização celular dessa citocina, seus efeitos colaterais são semelhantes ao do TNFi (Mueller *et al.*, 2021). A Abatacept, um anticorpo monoclonal, é composta pela fusão da região Fc da IgG1 ao domínio extracelular da CTLA-4, com mais afinidade com CD80/CD86. Este medicamento modula e inibe seletivamente a ativação de células T interferindo na coestimulação ao se ligar às moléculas CD80/CD86. Os seus efeitos adversos consistem em nasofaringite, náuseas, distúrbios hepáticos e infecções (Pan *et al.*, 2020; Mueller *et al.*, 2021).

3.4. CHALCONAS

As chalconas são metabolitos secundários pertencentes a classe dos flavonoides, presentes nas plantas comestíveis das famílias *Leguminosae*, *Compositae* e *Moraceae*. A chalcona é uma cetona α,β -insaturada, quimicamente caracterizada por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia alifática de três carbonos, podendo existir em duas formas isoméricas *trans* (E,1) e *cis* (Z, 2) (Figura 1). Em sua estrutura, há a presença de um cromóforo no qual conforma cor para as chalconas (Gomes *et al.*, 2017).

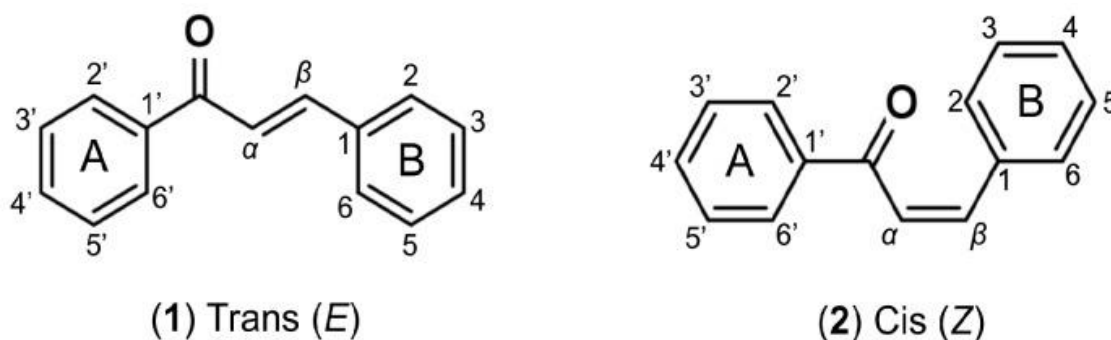


Figura 1: Isômeros trans e cis da chalcona (Gomes *et al.*, 2017).

Na natureza, as chalconas são constituintes vitais de algumas plantas medicinais e comestíveis. Já foi relatado cerca de 42 chalconas isolados do alcaçuz, uma planta medicinal utilizada em tratamento de doenças (Wang *et al.*, 2020). Maçãs, casca de laranja, tomate cereja, tomates, rizomas de raiz de dedo, são alguns exemplos de plantas nos quais já foram extraídas as chalconas (Li; Lo; Ho, 2006; Iijima *et al.*, 2008; Gosch *et al.*, 2009; Slimstad; Verheul, 2011)

Nos últimos anos, essa substância vêm ganhando destaque devido a seu amplo espectro de aplicações, suas propriedades químicas, biológicas, assim como pela sua versatilidade estrutural (Jasim *et al.*, 2021). Diversos estudos têm demonstrado que as chalconas apresentam atividades farmacológicas e biológicas de interesse, com ação antioxidante (Ghribia *et al.*, 2014), anti-inflamatória (Lin *et al.*, 2009), antiparasitária (Rodrigues *et al.*, 2016), antimicrobiana (Zampini; Vattuone; Isla, 2005), antiviral (Uchiumi *et al.*, 2003) e antitumoral (Sumiyoshi *et al.*, 2015).

Pequenas alterações moleculares na estrutura das chalconas podem conferir diferentes funções biológicas, além do vasto número de moléculas bioativas. As chalconas já demonstraram inibir moléculas como NF- κ B, TNF- α e VEGF (Yadav *et al.*, 2011; Lorusso; Marech, 2013). Também já foi observado a inibição da secreção de fosfolipase A2, COX e produção de espécies reativas de oxigênio por estas moléculas (Lee; Bukhari; Fauzi, 2015).

Lin e colaboradores em 2009, relatam que diferentes chalconas diminuem a produção de óxido nítrico, de PGE₂ e TNF- α por macrófagos de forma concentração dependente em ensaios *in vitro*. Em outro estudo em modelo *in vitro* e *in vivo*, foi observado a ação antimalárica da chalcona ligada a um radical de sulfato, assim como o aumento da expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias e diminuição a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Bhoj *et al.*, 2019). Um derivado da chalcona, o 3-fenil-1-(2,4,6-tris(metoximetoxi)fenil)prop-2-en-1-ona, demonstrou atividade anti-inflamatória em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, inibindo a atividade transcricional da AP-1, da produção de NO devido a inibição da expressão de iNOS e a redução concentração-dependente da secreção de TNF- α (Park *et al.*, 2009). Outro derivado, o trans-1,3-difenil-2,3-epoxipropano-1-ona (DPEP), também inibiu a expressão de iNOS e COX-2, conseqüentemente inibindo a produção de NO e PGE₂ (Kim *et al.*, 2013).

Ainda não há relato na literatura sobre o papel da chalcona (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona na modulação do sistema imunológico. O

presente trabalho investiga a influência desta molécula na produção de citocinas por macrófagos e linfócitos ativados *in vitro* e em modelo experimental *in vivo*. As chalconas possuem uma vasta área de aplicação, o que reforça que a síntese de novas estruturas químicas desta classe pode levar ao desenvolvimento de novas drogas com potencial atividade imunomoduladora, auxiliando no tratamento de doenças imunomediadas (Hussain e Ali, 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MOLÉCULAS

A síntese da nova chalcona (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (Figura 2) foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba e gentilmente cedidas ao nosso grupo de pesquisa para avaliação da atividade imunomoduladora. A violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como controle positivo nos ensaios de citotoxicidade. A dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), um glicocorticoide sintético, foi utilizada como controle positivo nos ensaios de imunomodulação. A concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), um mitogeno sintético, foi utilizada como ativador policlonal de linfócitos. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO (PanReac, Barcelona, Espanha) e diluídos em meio de cultura celular para uso nos ensaios.

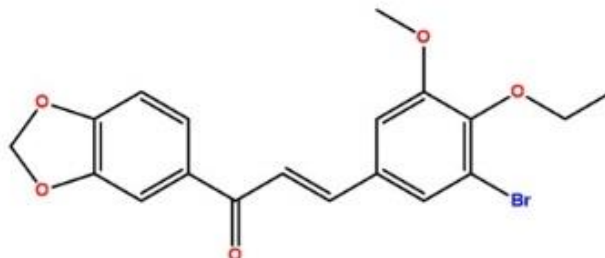


Figura 2: Estrutura química da chalcona (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (FERAI) (Silva, 2022)

4.2. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Células de linhagem J774-G8 oriundas de tumor em camundongos BALB/C foram obtidas após descongelamento e cultivadas em meio Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's médium - DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil). As células J774-G8 foram mantidas em cultura a 37°C e

5% de CO₂. Ao atingirem 80 a 90% de confluência, as células foram retiradas das garrafas de cultura, centrifugadas, ressuspensas em meio DMEM (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de SBF (Cultilab) e 50 µg/mL de gentamicina e contadas na câmara de Neubauer para posterior utilização nos ensaios.

4.3. OBTENÇÃO DE LINFÓCITOS

Os baços obtidos de camundongos BALB/C foram macerados em placa de petri com auxílio do êmbolo de uma seringa e, em seguida, os esplenócitos foram mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ em meio DMEM (GIBCO-BRL) suplementado com 10% SBF (Cultilab) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma) para a execução dos demais experimentos.

4.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Macrófagos da linhagem J774-G8 foram incubados em placa de 96 poços (2x10⁶ células/poço) em meio DMEM (GIBCO-BRL), suplementado com 10% de SBF (Cultilab) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os compostos foram testados em séries de seis concentrações (100µM – 3,125 µM, diluições 1:2), em triplicatas e incubados por 72 horas. Foi adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) por um período de 4h. A leitura no espectrofotômetro (Molecular Devices SpectraMax M2e Multi-Mode Microplate Reader) foi realizada a 570 e 600 nm. Os valores de CC₅₀ foram calculados utilizando *data-points* coletados de dois experimentos independentes no GraphPad Prism versão 9 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

4.5. DOSAGEM DE NITRITO E CITOCINAS

Macrófagos J774-G8 foram incubados em placas de 96 poços contendo meio DMEM (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de SBF (Cultilab) e 50 µg/ml de gentamicina (Novafarma), em triplicatas e estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS, 500 ng/mL, Escherichia coli sorotipo 0111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e IFN-γ (10 ng/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), além de tratados ou não com FERAI em diferentes concentrações (50µM – 6,25 µM, diluições 1:2). As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Após o período de incubação de 4 h, os sobrenadantes livres de células foram coletados, para

quantificação de TNF- α , e 24 h, para quantificações de IL-1 β , IL-12, IL-6, IL-10 e nitrito, e mantidos a -80 °C até o uso.

Esplenócitos de camundongos BALB/c foram semeados em placas de 96 poços em meio DMEM (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de SBF (Cultilab) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Novafarma) a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram estimuladas ou não com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Con A (Sigma-Aldrich) na ausência ou presença de FERAI (10 μM – 0,625 μM , diluições 1:2) ou dexametasona (5 μM , Sigma-Aldrich). Após 48 h de incubação, os sobrenadantes livres de células foram coletados e mantidos a -80° C até o uso para quantificação das citocinas IFN- γ e IL-2.

As dosagens de citocinas em sobrenadantes de culturas de macrófagos foram determinadas por ensaio imunoenzimático - ELISA usando o kit DuoSet (R&D Sistemas; Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos foi determinada através de seu produto oxidativo, o nitrito, pelo método de Griess (Green *et al.*, 1982). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Molecular Devices), com filtro de 450nm e 570nm, respectivamente.

4.6. LINFOPROLIFERAÇÃO

Esplenócitos de camundongos BALB/c foram cultivados em meio DMEM (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de SBF (Cultilab) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Novafarma), plaqueados a 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços, em triplicatas, na presença de Con A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich), do FERAI (50, 25 e 12,5 μM) ou dexametasona (Sigma-Aldrich) a 0,5 μM e incubados por 72 horas. Em seguida, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi retirado e adicionado 100 μL de meio com o reagente CellTiter® e levado para leitura no leitor de luminescência (FilterMax F3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, San Jose, California, Estados Unidos).

4.7. EDEMA DE PATA E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Grupos de camundongos BALB/c (n = 5) foram estimulados com carragenina a 2% (volume final de 20 μL /animal) na região subplantar das patas traseiras. O tratamento com o FERAI (formulação tópica a 1%) foi realizado diariamente e iniciado 4 horas após o estímulo com a

carragenina. Camundongos tratados com o creme base sem princípio ativo (veículo) foram utilizados como controles. O acompanhamento da espessura do edema na pata foi realizado com auxílio de um paquímetro antes do estímulo (tempo 0) e após 4, 24, 48 e 72 horas de tratamento.

As patas inflamadas de camundongos BALB/c foram coletadas após a eutanásia desses animais, fixadas em solução de 10% formaldeído por 48 horas. Fragmentos de tecido foram incorporados em parafina e cortes (3–5 μm de espessura) foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina convencionais e analisados qualitativamente por microscopia óptica (GUIMARÃES, 2009).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni foram utilizados para determinar a significância estatística das comparações entre os grupos nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 9 (Graph Pad Software).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FERAI APRESENTA BAIXA CITOTOXIDADE

O FERAI apresentou valor de CC_{50} de $57,63 \pm 11,84 \mu\text{M}$, demonstrando uma citotoxicidade baixa para macrófagos murinos quando comparado a violeta de genciana (CC_{50} de $0,7 \pm 0,09$). A dexametasona, um dos glicocorticoides de referência no tratamento de doenças imunomediadas, apresentou o valor de CC_{50} de $33,83 \pm 0,13 \mu\text{M}$ (Tabela 1).

A citotoxicidade é um parâmetro inicial para avaliar o potencial de substâncias químicas em causar ou não danos às células e tecidos (O'Brien *et al.*, 2000). Mello e colaboradores (2014) também observaram atividade não citotóxica de diferentes chalconas com o valor de CC_{50} superior a $199 \mu\text{M}$ para macrófagos murinos. Na literatura também é descrito que as chalconas são pouco citotóxicas em outras linhagens celulares como A549 (células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar), A498 (células de câncer renal humano), HeLa (células cervicais cancerosas), A375 (células de melanoma), HepG2 (células de carcinoma hepatocelular) (Letafat *et al.*, 2013; de Mello *et al.*, 2014; Otero *et al.*, 2014; Burmaoglu *et al.*, 2022), corroborando com os dados observados nos testes com o FERAI.

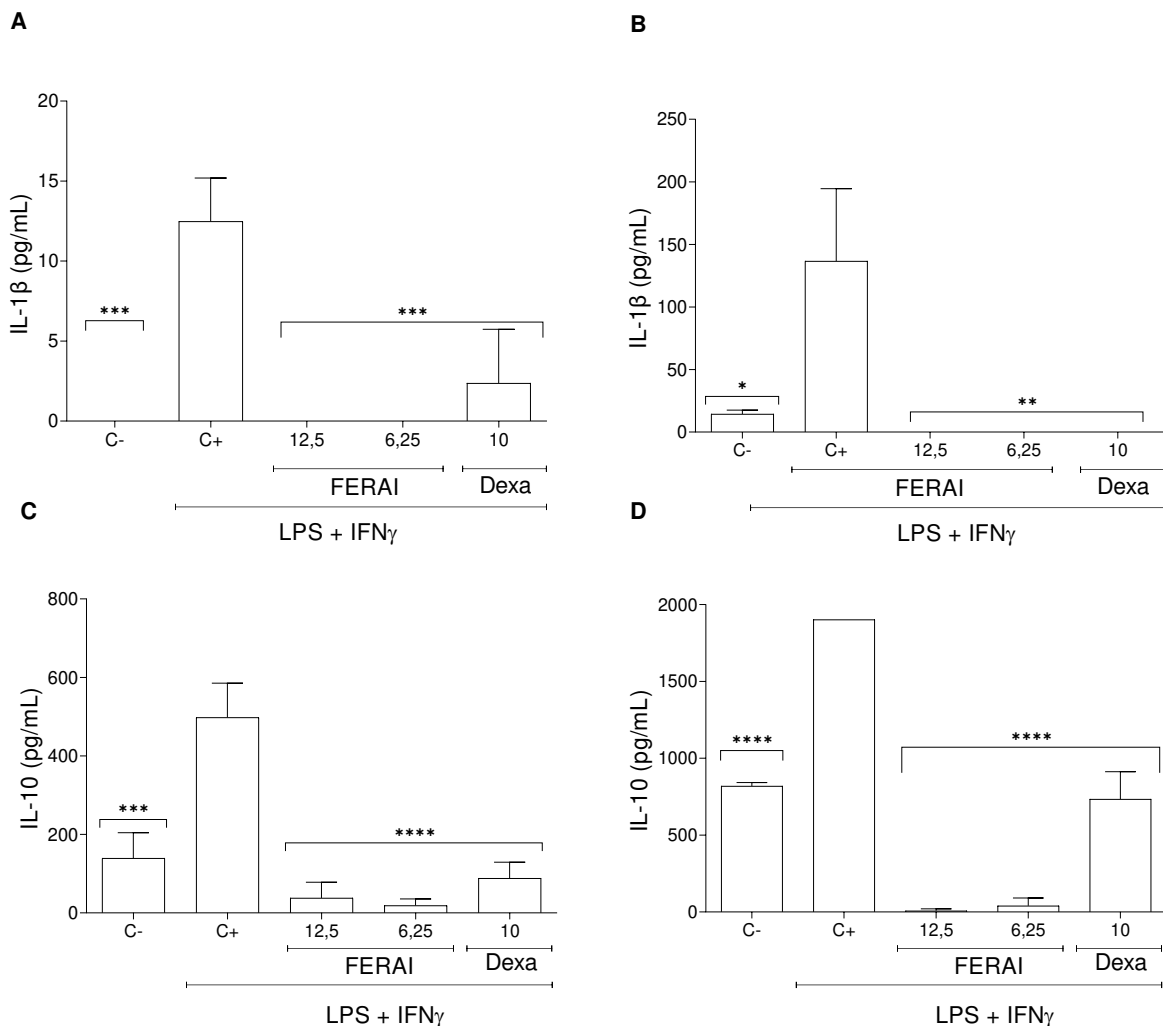
Tabela 1. Avaliação da citotoxicidade do FERAI em macrófagos murinos da linhagem J774-G8.

MOLÉCULAS	$CC_{50} \pm D.P$ M ϕ J774-G8 (μM)
FERAI	$57,63 \pm 11,84$
DEXA	$33,83 \pm 0,13$
VG	$0,7 \pm 0,09$

VG= Violeta de Genciana; DEXA: Dexametasona; CC₅₀= concentração citotóxica de 50%. Valores calculados a partir de dois experimentos independentes.

5.2. FERAI INIBE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E DE NITRITO POR MACRÓFAGOS ATIVADOS

Em sequência, o efeito do FERAI na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e do nitrito por macrófagos ativados foi avaliado. A adição de LPS e IFN- γ às culturas estimulou a produção de NO e a secreção de todas as citocinas acima mencionadas. A produção de IL-1 β e de IL-10 diminuiu significativamente após 24 e 48 horas de tratamento com FERAI quando comparados ao grupo controle, apenas estimulado com LPS e IFN- γ (Figura 3 A, B, C e D). Após 24 horas de tratamento, a produção de IL-6 e IL-12 foram estatisticamente reduzidas na concentração de 10 μ M (Figura 3 E e F). O FERAI também reduziu a produção de TNF- α após 4 horas de tratamento (Figura 3 G). Além disso, o FERAI diminuiu a produção de NO em todas as concentrações testadas após 24 horas de tratamento (Figura 3 H).



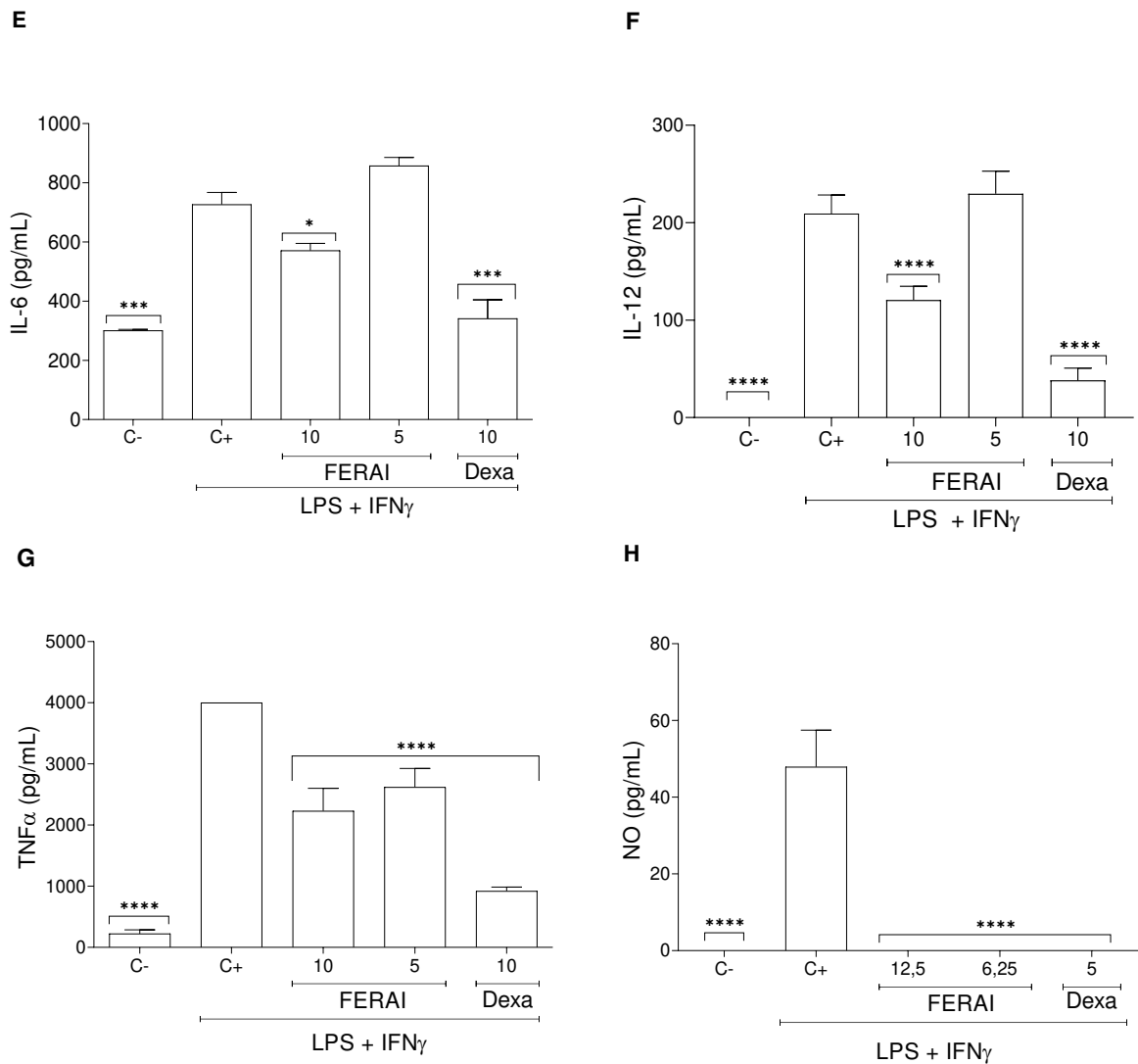


Figura 3: Produção de citocinas e nitrito por macrófagos ativadas após tratamento ou não com o FERAI. Dosagens de: (A e B) IL-1 β após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente; (C e D) IL-10 após 24 horas e 48 horas de tratamento, respectivamente; (E e F) IL-6 e IL-12 após 24 horas de tratamento, respectivamente; (G) TNF- α após 4 horas de tratamento; (H) Nitrito após 24 horas de tratamento; (I) IL-12 após 24 horas de tratamento. Os asteriscos indicam a comparação entre as células estimuladas e tratadas com as células apenas estimuladas com o LPS (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Os dados são representativos de três experimentos realizados.

Esses achados corroboram com o estudo recente realizado com células de câncer. Neste estudo foi observado que a chalcona 1-(4-(Metilsulfonyl)fenil)-3-(feniltio)-3-(p-tolil)propan-1-ona diminuiu a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , importantes citocinas pro-inflamatórias associadas à invasão, angiogênese e supressão da imunidade antitumoral (Nourbakhsh *et al.*,

2023). Outros dois estudos em modelo animal observaram que chalconas são capazes de reduzir os níveis séricos das citocinas IL-4 e IL-10 (Zhao; Jiao; Wang, 2020; Mukherjee *et al.*, 2022). Kim e colaboradores em 2014 também observaram resultados semelhantes em relação a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos, o estudo relatou que a chalcona TI-I-174 teve o potencial inibitório com IC₅₀ de 5,75 µM.

Estas citocinas são conhecidas por desempenharem papéis fundamentais na indução da inflamação por macrófagos. Há associação de elevados níveis de TNF- α e de IL-6 com a pancreatite aguda (Staubli; Oertli; Nebiker, 2015) e ao aumento do risco de letalidade na infecção por SARS-COV-2 (Del Valle *et al.*, 2020). A produção aumentada de IL-1 β e de TNF- α é observada em casos de prostatite crônica e artrite gotosa, causando danos ao tecido articular (Ho *et al.*, 2020) . Embora a IL-4 e a IL-10 sejam citocinas anti-inflamatórias, estudos demonstram que ambas podem ser prejudiciais em casos de esofagite eosinofílica ativa (Hirano *et al.*, 2020) e tuberculose espinhal em coelho (Zhao; Jiao; Wang, 2020), respectivamente. A modulação dessas citocinas se torna crucial para o desenvolvimento de uma resposta protetora em diferentes enfermidades.

5.3. FERAI INIBE A LINFOPROLIFERAÇÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM LINFÓCITOS MURINOS ATIVADOS

A influência do FERAI na proliferação e na produção de citocinas por esplenócitos murinos também foi avaliada. Esta molécula suprimiu a resposta proliferativa de linfócitos de forma dependente da concentração. Corroborando com este resultado, o FERAI reduziu significativamente a produção da citocina associada à proliferação de linfócitos, a IL-2 (Figura 4). Além disso, o FERAI reduziu a produção do IFN- γ por linfócitos ativados (Figura 5). A dexametasona apresentou efeito inibitório sobre a linfoproliferação e a produção de citocinas, mesmo na concentração de 5 µM (Figuras 4 e 5).

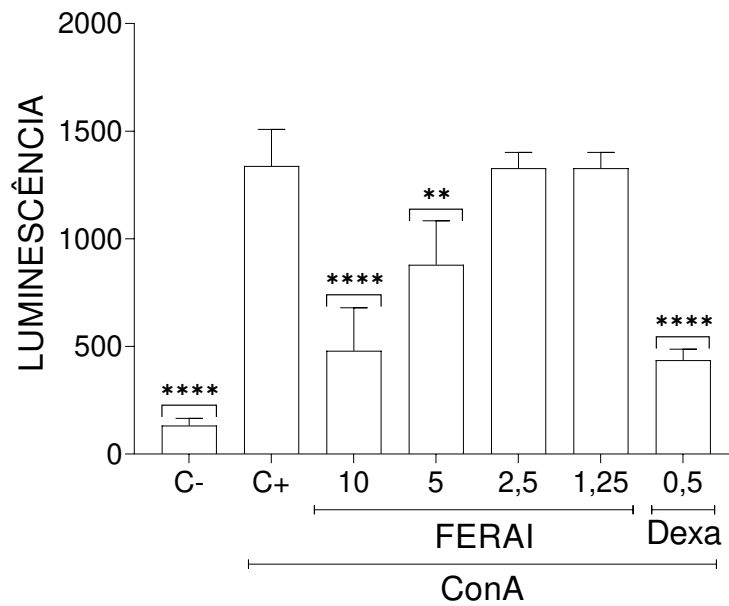


Figura 4: Inibição da proliferação de linfócitos por FERAI. Esplenócitos BALB/c foram estimulados com Con A na presença ou não de FERAI (10, 5, 2,5 e 1,25 μ M) ou dexametasona (Dexta; 5 μ M). A proliferação foi avaliada após 72 horas de tratamento. Os valores representam as médias \pm SEM de três determinações. Os asteriscos comparam as células estimuladas e tratadas com aquelas estimuladas com Con A (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

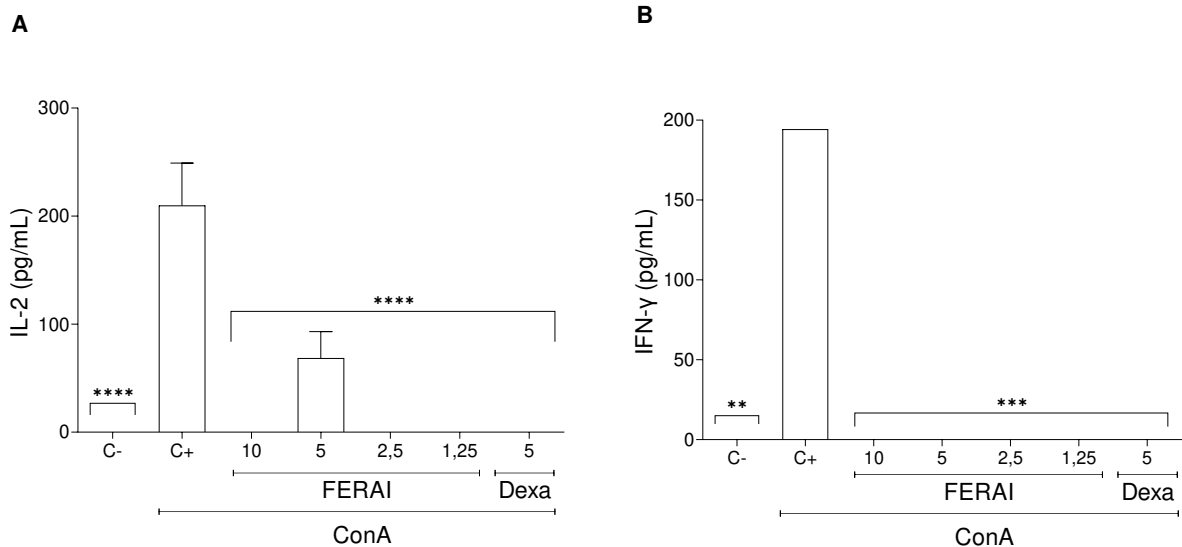


Figura 5: FERAI inibe a produção de citocinas de linfócitos. Esplenócitos BALB/c foram estimulados com Con A na presença ou não de FERAI (10, 5, 2,5 e 1,25 μ M) ou dexametasona (Dexta; 5 μ M). Mensurações de: (A) IL-2; (B) IFN- γ , ambos após 24 horas de tratamento. Os

asteriscos indicam a comparação entre as células estimuladas e tratadas com as células apenas estimuladas com Con A (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Estudos demonstram que compostos derivados de chalconas inibem a proliferação de linfócitos ativados (Barfod *et al.*, 2002; De León *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009). A xantohumol inibiu a proliferação de linfócitos murinos nas concentrações de 40-1,25 μM , demonstrando atividade semelhante a observada em nosso estudo. Além disso, esse estudo também observou que a xantohumol foi capaz de diminuir a produção de citocinas Th1, como IL-2, IFN- γ e TNF- α (Gao *et al.*, 2009). Barfod e colaboradores (2002) observaram que a Licochalcona A e outras 3 derivações dessa chalcona inibiram a proliferação de linfócitos humanos nas concentrações de 0,5-25 μM . Outro estudo analisou a atividade da 1-(2,3,4- trimethoxyphenyl)-3-(3-(2-chloroquinoliny)-2-propen-1-one (TQ), a qual também diminuiu a linfoproliferação de forma concentração dependente (De León *et al.*, 2003). Nossos achados divergem de outro estudo, no qual os autores não conseguiram associar a diminuição da produção de IL-2 e IFN- γ após o tratamento com a hesperidina metil chalcona (HMC), de acordo com os autores, mais testes são necessários para entender a razão na qual a HMC não foi capaz de diminuir a produção dessas citocinas (Zhao; Jiao; Wang, 2020).

A redução da ativação e da proliferação de linfócitos T desempenha um papel crucial na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, infecções virais e rejeição de transplantes e tumores. Quando as células T são ativadas com agentes mitógenos como Con A, passam a expressar na sua superfície receptores de IL-2 e a produzir esta citocina, disparando a proliferação linfocitária (Zhou *et al.*, 2020). Os linfócitos T ativados também começam a produzir IFN- γ , essa citocina é liberada e induz o aumento da produção de outras citocinas pró-inflamatórias em macrófagos. O IFN- γ juntamente com TNF- α potencializam a inflamação (Platanias, 2005).

5.4. FERAI DIMINUI O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A partir dos resultados promissores observados nos ensaios *in vitro*, o potencial do FERAI em modular a inflamação em camundongos BALB/c foi avaliada. Para este fim, a carragenina foi injetada na região subplantar das patas traseiras, desencadeando uma reação inflamatória na área com formação de edema. Os grupos de camundongos foram tratados diariamente com o composto (formulação tópica a 1%) ou com o creme base sem princípio ativo (veículo).

Conforme observado na figura 6, o FERAI reduziu significativamente o tamanho do edema de pata quando comparado aos camundongos administrados apenas com o veículo, especialmente nos tempos de 4 e 72 horas.

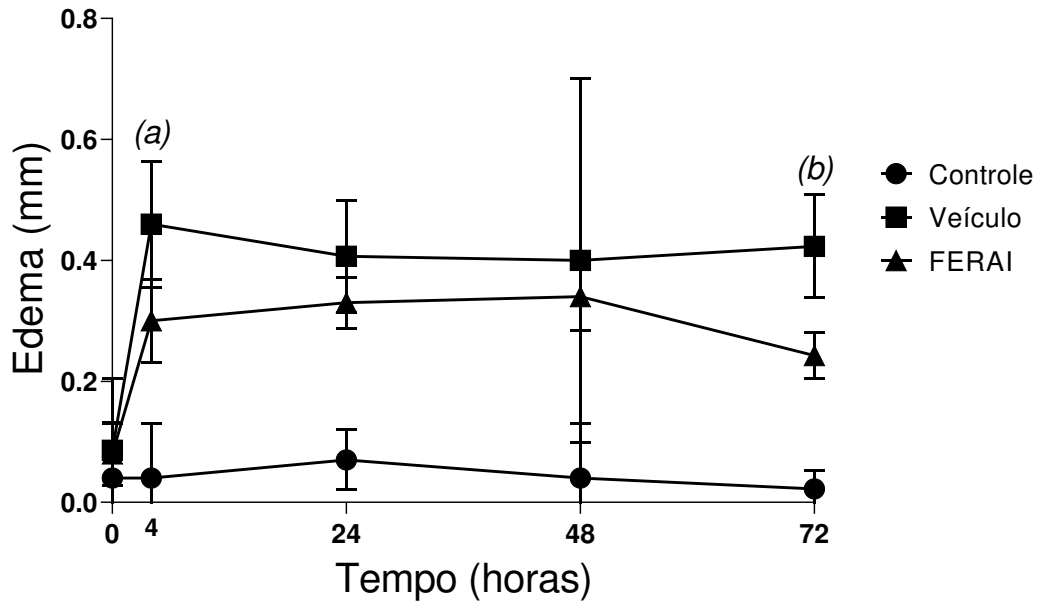


Figura 6: FERAI diminui o edema de pata induzido por carragenina. O edema da pata foi induzido por injeção subplantar de 0,2 ml de carragenina a 1% na pata traseira direita do camundongo BALB/c. Grupos de camundongos foram tratados com FERAI (formulação tópica a 1%) após 4 horas de indução do edema. O veículo refere-se ao grupo tratado apenas com o creme base sem princípio ativo. O grupo controle refere-se aos camundongos sem indução de edema e sem tratamento. O tamanho da lesão foi determinado pela avaliação semanal da diferença na espessura entre as almofadas plantares contralaterais infectadas e não infectadas. (a) $*p < 0,05$; (b) $**p < 0,01$ usando o teste ANOVA. Os valores representam as médias EP de cinco camundongos por grupo de um experimento de dois realizados.

Alterações histopatológicas também se correlacionaram com a progressão da lesão. Os camundongos administrados apenas com o veículo tinham um intenso infiltrado inflamatório contendo macrófagos e linfócitos, com extensas áreas de edema (Figura 7B e C). Após o tratamento com FERAI, os camundongos apresentavam um tecido mais organizado e menor área de edema, apesar da presença dos mesmos tipos celulares (Figura 7D, E e F)

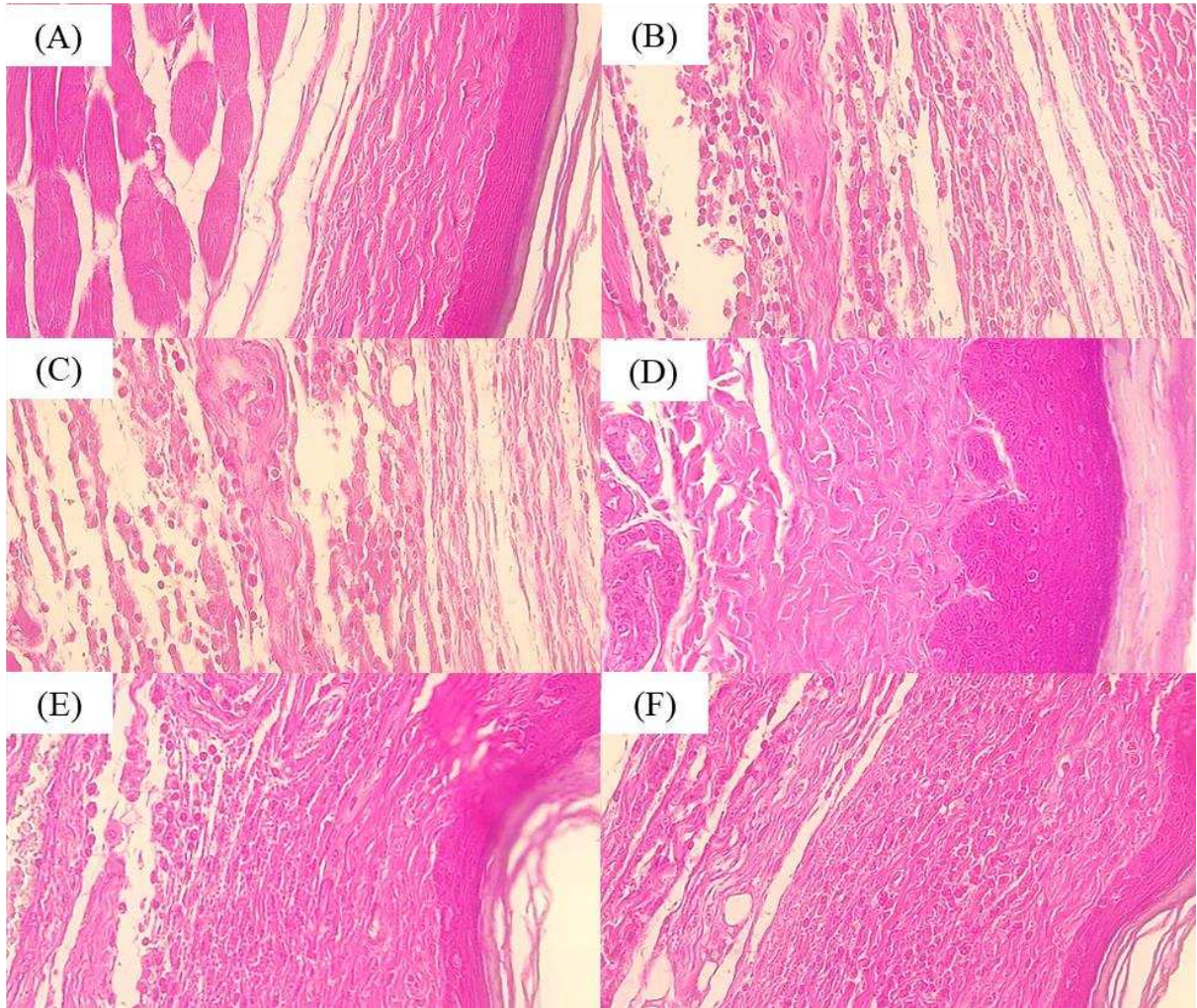


Figura 7: O tratamento tópico com FERAI diminui o crescimento da lesão. Após 4 horas de estímulo, os camundongos foram tratados com FERAI (formulação tópica a 1%). Após 72 horas de tratamento, as patas estimuladas de camundongos BALB/c foram removidas e fixadas com solução de formaldeído (10%). Cortes de tecido foram corados por hematoxilina e eosina e observados sob microscopia de luz: (A) Patas de camundongos sem estímulo - controle; (B e C) Camundongos estimulados e não tratados – Veículo; (D, E e F) Camundongos estimulados e tratados com FERAI. Aumento x400.

A carragenina é um agente oleoso que possui ação irritante no local onde foi administrado. Após as primeiras horas, ocorre a liberação de histamina e bradicinina, o que leva a uma reação em cadeia como dilatação dos vasos sanguíneos, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento do líquido plasmático causando o edema. Em seguida, ocorre a diapedese leucocitária elevando-se a quantidade de neutrófilos e, em seguida, de macrófagos no tecido, o que acarreta no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), exacerbando a inflamação (Winter; Risley; Nuss, 1962).

A indução do edema nas patas por carragenina é amplamente usado no intuito de avaliação de atividade anti-inflamatória. Calimag e colaboradores utilizaram essa metodologia para observar o papel da própolis de abelha sem ferrão das Filipinas na inflamação aguda, a própolis é enriquecida em flavonoides e ácidos fenólicos, o que a tornou capaz de atenuar o edema de pata causada por carragenina e níveis séricos de TNF- α , corroborando com os nossos resultados (Calimag *et al.*, 2021). Em outro estudo, a chalcona TQ foi capaz de reduzir em 54% do edema de pata (De León *et al.*, 2003). Pinheiro-Riberio e colaboradores analisaram que a HMC reduziu o edema de pata induzido por carragenina nos tempos de 1-5h nas concentrações de 30 e 100mg/kg (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2015).

Elementos de halogênios, nos últimos anos, vem sendo incorporados ao desenvolvimento de novos fármacos. Na relação estrutura-atividade, os halogênios são utilizados principalmente para aumentar a permeabilidade da membrana e aumento da meia vida de fármacos, podendo impactar na seletividade do alvo e na lipofilicidade (Inspired; Marine; Space, 2017). O FERAI possui o bromo na sua constituição, o que possivelmente otimizou o seu potencial.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o FERAI possui importante atividade imunossupressora e anti-inflamatória, inibindo a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas por linfócitos e macrófagos murinos *in vitro* e modulando as alterações teciduais em resposta ao edema de pata em modelo experimental *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AHAMADA, Mariame Mohamed; JIA, Yang; WU, Xiaochuan. Macrophage Polarization and Plasticity in Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. December, p. 1–12, 2021.

ATIQUI, Sadaf *et al.* Immunogenicity of TNF-Inhibitors. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. February, p. 1–13, 2020.

BARFOD, Lea *et al.* Chalcones from Chinese liquorice inhibit proliferation of T cells and production of cytokines. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 545–555, 2002.

BARRETT, Tessa J. Macrophages in Atherosclerosis Regression. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 20–33, 2020. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.119.312802>.

BHOJ, Priyanka *et al.* Immunomodulatory Activity of Sulfonamide Chalcone Compounds in Mice Infected with Filarial Parasite, *Brugia malayi*. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 225–229, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0727-5>.

BRENNER, Dirk; BLASER, Heiko; MAK, Tak W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: Live or let die. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 362–374, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3834>.

BRODERICK, Lori; HOFFMAN, Hal M. IL-1 and autoinflammatory disease: biology, pathogenesis and therapeutic targeting. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 448–463, 2022.

BULLOCK, Jacqueline *et al.* Rheumatoid arthritis: A brief overview of the treatment. **Medical Principles and Practice**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 501–507, 2019.

BURMAOGLU, Serdar *et al.* Design, synthesis and antiproliferative activity evaluation of fluorine-containing chalcone derivatives. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 3525–3550, 2022.

CAIN, Derek W.; CIDLOWSKI, John A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192415>.

CALIMAG, Katrina Paz D. *et al.* Attenuation of carrageenan-induced hind paw edema and plasma tnf- α level by philippine stingless bee (*Tetragonula biroi* friese) propolis. **Experimental Animals**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 185–193, 2021.

DA SILVA, Juliana Cruz *et al.* Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **Clinics**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 766–771, 2013.

DE LEÓN, E. J. *et al.* 1-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)-3-(3-(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivative with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 246–257, 2003.

DE MELLO, Tatiane F.P. *et al.* Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 27–34, 2014.

DEL VALLE, Diane Marie *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature medicine**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32839624>.

FAUCI, Anthony S.; MOUTSOPOULOS, Haralampos M. Polyclonally triggered B cells in the peripheral blood and bone marrow of normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus and primary sjögren's syndrome. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 577–584, 1981.

FUSTER, José J. *et al.* Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 254–264, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvp363>.

GAO, Xiaohua *et al.* Immunomodulatory activity of xanthohumol: Inhibition of T cell proliferation, cell-mediated cytotoxicity and Th1 cytokine production through suppression of NF- κ B. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 477–484, 2009.

GHRIBIA, Lotfi *et al.* Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of extracts and secondary metabolites from *Acacia cyanophylla*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 4, n. Suppl 1, p. S417–S423, 2014. Disponível em:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S222116911530304X>.

GINHOUX, Florent; JUNG, Steffen. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3671>.

GOMES, Marcelo N. *et al.* Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 8, 2017.

GORONZY, Jörg J.; WEYAND, Cornelia M. Rheumatoid arthritis. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 204, p. 55–73, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790350>.

GOSCH, Christian *et al.* Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). **Plant Science**, [s. l.], v. 176, n. 2, p. 223–231, 2009.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUILLIAMS, Martin; MILDNER, Alexander; YONA, Simon. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 595–613, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>.

GUIMARÃES, Elisalva T. *et al.* Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 84–87, 2009.

HIRANO, Ikuo *et al.* Efficacy of Dupilumab in a Phase 2 Randomized Trial of Adults With Active Eosinophilic Esophagitis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 111-122.e10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.09.042>.

HIRANO, T. *et al.* Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 228–231, 1987.

HO, Dong-Ru *et al.* Beneficial Effects of Inflammatory Cytokine-Targeting Aptamers in an Animal Model of Chronic Prostatitis. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 111-122.e10, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32486412>.

HU, Xiaoyu; IVASHKIV, Lionel B. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- γ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. **Immunity**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 539–550, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833085>.

IJIMA, Yoko *et al.* Metabolite profiling of chalcones and flavanones in tomato fruit. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 94–102, 2008.

INSPIRED, Marine; MARINE, Uniquely; SPACE, Chemical. Marine Inspired as Modulators of Serotonin Receptors : An Example Illustrating the Power of Bromine as Part of the. [s. l.], p. 1–14, 2017.

ITALIANI, Paola; BORASCHI, Diana. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 5, n. OCT, p. 1–22, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00514/abstract>.

IWASZKO, Milena; BIAŁY, Sylwia; BOGUNIA-KUBIK, Katarzyna. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3000, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34831223>.

JANG, Dan In *et al.* The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 1–16, 2021.

JANG, Sunhee; KWON, Eui Jong; LEE, Jennifer Jooha. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, 2022.

JASIM, Hiba A. *et al.* Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 8, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34439870>.

KIM, Kil-Nam *et al.* Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, [s. l.], v. 53, p. 371–5, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.021>.

KIRIAKIDOU, Marianthi; CHING, Cathy Lee. Systemic Lupus Erythematosus. **Annals of internal medicine**, [s. l.], v. 172, n. 11, p. ITC81–ITC96, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32479157>.

KOELWYN, Graeme J. *et al.* Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 526–537, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41590-018-0113-3>.

KUHN, Annegret; RULAND, Vincent; BONSMANN, Gisela. Cutaneous lupus erythematosus: Update of therapeutic options: Part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. e195–e213, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2010.06.017>.

KWAK, Kihyuck; AKKAYA, Munir; PIERCE, Susan K. B cell signaling in context. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 963–969, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-019-0427-9>.

LEE, Jian Sian; BUKHARI, Syed Nasir Abbas; FAUZI, Norsyahida Mohd. Effects of chalcone derivatives on players of the immune system. **Drug design, development and therapy**, [s. l.], v. 9, p. 4761–78, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26316713>.

LEE, Dennis S.W.; ROJAS, Olga L.; GOMMERMAN, Jennifer L. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 179–199, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-00092-2>.

LETAFAT, Bahram *et al.* **Synthesis and In vitro Cytotoxic Activity of Novel Chalcone-like Agents** *Iran J Basic Med Sci.* [S. l.: s. n.], 2013.

LI, Shiming; LO, Chih-Yu; HO, Chi-Tang. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 12, p. 4176–85, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756344>.

LIN, Chien-Tsong *et al.* Anti-inflammatory activity of Flavokawain B from *Alpinia pricei* Hayata. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 14, p. 6060–5, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19537711>.

LIU, Dora *et al.* A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 30, 2013. Disponível em: Allergy, Asthma & Clinical Immunology.

LIU, Yan-Cun *et al.* Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International journal of biological sciences**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 520–9, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910531>.

LORUSSO, Vito; MARECH, Ilaria. Novel plant-derived target drugs: A step forward from licorice?. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 333–335, 2013.

LOZA, Matthew J. *et al.* Assembly of Inflammation-Related Genes for Pathway-Focused Genetic Analysis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. e1035, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940599>.

MARTINEZ, Fernando O.; HELMING, Laura; GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 27, p. 451–483, 2009.

MOUSSET, Charlotte M. *et al.* Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. **Cytometry Part A**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 647–654, 2019.

MUELLER, Anna-Lena *et al.* Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3017, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34831240>.

MUKHERJEE, Sitabja *et al.* Oral Therapy Using a Combination of Nanotized Antimalarials and Immunomodulatory Molecules Reduces Inflammation and Prevents Parasite Induced Pathology in the Brain and Spleen of *P. berghei* ANKA Infected C57BL/6 Mice. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. January, p. 1–17, 2022.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27455818>.

NETEA, Mihai G. *et al.* Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 13–26, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>.

NOURBAKSH, Mitra *et al.* Attenuation of Inflammatory Responses in Breast and Ovarian Cancer Cells by a Novel Chalcone Derivative and Its Increased Potency by Curcumin. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2023, 2023.

O'BRIEN, John *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OKON, L. G.; WERTH, V. P. Cutaneous lupus erythematosus: Issues in diagnosis and treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 365–381, 2009. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=2009554096>.

OTERO, Elver *et al.* Synthesis, leishmanicidal and Cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 13251–13266, 2014.

PAN, Lu *et al.* Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. **World journal of pediatrics : WJP**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 19–30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12519-019-00229-3>.

PARK, Pil Hoon *et al.* KB-34, a newly synthesized chalcone derivative, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages via heme oxygenase-1 induction and blockade of activator protein-1. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 606, n. 1–3, p. 215–224, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.034>.

PERS, Jacques Olivier *et al.* BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1050, n. 33, p. 34–39, 2005.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A. *et al.* Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 228, p. 88–99, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.011>.

PLATANIAS, Leonidas C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 375–386, 2005.

PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, [s. l.], v. 302, p. 2–22, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>.

REINA-CAMPOS, Miguel; SCHARPING, Nicole E.; GOLDRATH, Ananda W. CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 718–738, 2021.

RINCÓN, Mercedes *et al.* Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 185, n. 3, p. 461–469, 1997.

ROCHAS, Caroline *et al.* Transmembrane BAFF from rheumatoid synoviocytes requires interleukin-6 to induce the expression of recombination-activating gene in B lymphocytes. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 1261–1271, 2009.

RODRIGUES, Danilo *et al.* Trypanocidal Activity of Flavokawin B, a Component of *Polygonum ferrugineum* Wedd. **Planta Medica**, [s. l.], v. 83, n. 03/04, p. 239–244, 2016. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-112031>.

ROE, Kevin. An inflammation classification system using cytokine parameters. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 6–10, 2021.

RUSSO, Lucia; LUMENG, Carey N. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. **Immunology**, [s. l.], v. 155, n. 4, p. 407–417, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.13002>.

SARAIVA, Margarida *et al.* Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 217, n. 1, p. 1–19, 2020.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.26429>.

SLIMESTAD, Rune; VERHEUL, Michel. Properties of chalconaringenin and rutin isolated from cherry tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 3180–3185, 2011.

STAUBLI, Sebastian Manuel; OERTLI, Daniel; NEBIKER, Christian Andreas. Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 273–83, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/10408363.2015.1051659>.

SUMIYOSHI, Maho *et al.* Antitumor and antimetastatic actions of xanthoangelol and 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots through the inhibited activation and differentiation of M2 macrophages. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 22, n. 7–8, p. 759–767, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.05.005>.

SWIRSKI, Filip K.; NAHRENDORF, Matthias. Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. **Science**, [s. l.], v. 339, n. 6116, p. 161–166, 2013. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1230719>.

TABAS, Ira; LICHTMAN, Andrew H. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. **Immunity**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 621–634, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317304193>.

UCHIUMI, Fumiaki *et al.* Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. **Antiviral research**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 89–98, 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354202001869>.

VIGNALI, Dario A A; KUCHROO, Vijay K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 722–728, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22814351>.

VILLARINO, Alejandro V; KANNO, Yuka; O'SHEA, John J. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. **Nature immunology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 374–384, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.3691>.

WANG, Danni *et al.* Natural Chalcones in Chinese Materia Medica: Licorice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2020, 2020.

WANG, Xiaoting *et al.* Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. a028548, 2019. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a028548>.

WILLS-KARP, Marsha. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical**

Immunology, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 9–18, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11149983>.

WINTER, Chareles A; RISLEY, Edwin A; NUSS, George W. Carrageenin-induced edema in hind paw. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 111, p. 544–547, 1962.

YADAV, Vivek R. *et al.* The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 295–309, 2011.

YAO, Yongli; XU, Xiang-Hong; JIN, Liping. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. MAR, p. 792, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31037072>.

YATIM, Karim M; LAKKIS, Fadi G. A brief journey through the immune system. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1274–81, 2015. Disponível em: <https://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.10031014>.

YOUINO, Pierre; SARAUX, Alain; PERS, Jacques-Olivier. B-Lymphocytes Govern the Pathogenesis of Sjogren's Syndrome. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 2071–2077, 2012.

ZAMPINI, Iris C.; VATTUONE, Marta A.; ISLA, Maria I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 450–6, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874105004617>.

ZARGHI, Afshin; ARFAEI, Sara. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 655–83, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813081/pdf/ijpr-10-655.pdf><https://www.semanticscholar.org/paper/Selective-COX-2-Inhibitors%3A-A-Review-of-Their-Zarghi-Arfaei/83b076e75f4b75e46181d19873b9fb261c1341ce><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/arti>.

ZHAO, Yi; JIAO, Yong; WANG, Lei. Hesperidin methyl chalcone alleviates spinal tuberculosis in New Zealand white rabbits by suppressing immune responses. **The journal of spinal cord medicine**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 532–539, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30124375>.

ZHOU, Xiujuan *et al.* Interleukin-2 (IL-2) Interacts With IL-2 Receptor Beta (IL-2R β): Its Potential to Enhance the Proliferation of CD4+ T Lymphocytes in Flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 11, n. September, p. 531785, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33013923>.

ZHOU, Sheng; LU, Hongcheng; XIONG, Min. Identifying Immune Cell Infiltration and Effective Diagnostic Biomarkers in Rheumatoid Arthritis by Bioinformatics Analysis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. August, p. 1–13, 2021.

ANEXOS

Anexo 1: Submissão do artigo intitulado “INHIBITION OF THE IMMUNE RESPONSE BY NEW BROMINATED CHALCONE ON MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES IN VITRO AND IN EDEMA MURINE MODEL” à revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

Anexo 2: Comprovante de submissão

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
✉ Contact Journal ADM: Admin, BJPS	BJPS- 2024- 0571	INHIBITION OF THE IMMUNE RESPONSE BY NEW BROMINATED CHALCONE ON MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES IN VITRO AND IN EDEMA MURINE MODEL View Submission	17-Jul-2024	29-Jul-2024
<ul style="list-style-type: none">• Awaiting Admin Processing				

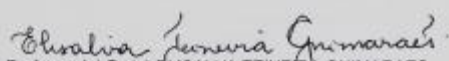
Anexo 3: Folha de Aprovação

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA EM MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS MURINOS"

LAISIA FALCAO ALONSO UZEDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 26 de julho de 2024, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professor(a) Dr.(a) ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES

Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Doutorado em Patologia

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA

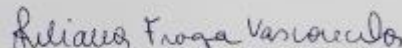


Professor(a) Dr.(a) AqASSIA BENJAMIM LEAL PIRES

Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Doutorado em Genética e Biologia Molecular

Universidade Estadual de Campinas



Professor(a) Dr.(a) JULIANA FRAGA VASCONCELOS

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Universidade Estadual de Feira de Santana

**INHIBITION OF THE IMMUNE RESPONSE BY NEW BROMINATED CHALCONE
ON MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES IN VITRO AND IN EDEMA MURINE
MODEL**

Laísia Falcão Alonso Uzêda^{1,2*}, Beatriz Cerqueira dos Santos^{1,2}, Catarina Araujo Menezes Campos^{1,2}, Gleice Rayanne Silva³, Fernando Leite Ferreira³, Felipe Sarmento Guerra³, Luís Cesar Rodrigues³, Hemerson Iury Ferreira Magalhães³, Francisco Jaime Bezerra Junior Mendonça³, Cassio Santana Meira^{2,4}, Milena Botelho Pereira Soares^{2,4}, Elisalva Teixeira Guimarães^{1,2*}

¹Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular, Departamento de Ciências da Vida
Universidade Do Estado da Bahia (UNEB), Salvador, Bahia, Brazil

²Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil

³Laboratório de Química Orgânica, Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴Instituto Senai de Inovação Em Sistemas Avançados Em Saúde, SENAI/CIMATEC
Salvador, Bahia, Brazil

Short running title: Immunomodulatory activity of FERAI.

Corresponding author:

Elisalva Teixeira Guimarães

Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Rua Silveira Martins, 2555, Departamento de Ciências da Vida, Cabula, Salvador, BA, Brazil.

CEP: 41.150-000.

Telephone: +55-71-98154-7094, E-mail: etguimaraes@uneb.br

Abstract

Disturbances in the immune system function can result in immune-mediated disease. This dysregulation involves an imbalance between mediators produced by different cell types, including macrophages and lymphocytes. Compounds stimulating or inhibiting the immune response have been investigated to prevent these diseases. Here, we evaluated the potential of the new brominated chalcone (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (FERAI) to modulate the immune response of macrophages and lymphocytes in vitro and in paw edema murine model. FERAI presented low cytotoxicity and reduced the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages (IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α) and lymphocytes (IL-2 and IFN- γ), when compared to stimulated but untreated cells. Curiously, FERAI also reduced significantly the production of IL-10 at all tested concentrations. Moreover, FERAI inhibited lymphocyte proliferation in a concentration-dependent fashion. Additionally, FERAI was able to reduce paw edema and inflammatory infiltrate in BALB/c mice. These results provide directions for future studies with FERAI and its important pharmaceutical and immunomodulatory value.

Keywords: Macrophages, Lymphocytes, Chalcones, Immunomodulation, Inflammation.

INTRODUCTION

Drug therapy for immune-mediated diseases is primarily directed toward reducing excessive inflammation and relieving symptoms. However, patient adherence can be complicated due to serious side effects, high dosages, and long treatment time. Faced with these challenges, the search for therapeutic alternatives is constant (Bullock *et al.*, 2019). Chalcones and their derivatives, belonging to the flavonoid class, have gained evidence in recent years due to their wide spectrum of applications, their chemical and biological properties, as well as their structural versatility (Jasim *et al.*, 2021). Chalcones are fundamental constituents of several medicinal and edible plants. These substances are chemically characterized by two aromatic rings linked by a three-carbon aliphatic chain. Extracted from plants such as licorice, apples, tomatoes and finger roots, chalcones have gained attention due to their wide spectrum of applications and chemical and biological properties (Gomes *et al.*, 2017). Studies have demonstrated that chalcone derivatives have pharmacological and biological activities of interest, with antioxidant, anti-inflammatory (Sumiyoshi *et al.*, 2015), antiparasitic, antimicrobial (Rodrigues *et al.*, 2016), antiviral (Uchiumi *et al.*, 2003) and antitumor (Sumiyoshi *et al.*, 2015).

This broad spectrum of biological actions together with the versatility of this class of molecules, leads to the obtaining of new chemical structures of chalcones and reinforces the need to develop alternative treatments that are less toxic and more accessible to patients with different diseases that affects the immune system (Gomes *et al.*, 2017). Our research group has been dedicated to evaluating the antiparasitic and immunomodulatory activity of chalcones and their derivatives. *In silico* predictive studies suggested a immunomodulatory activity of bromo-chalcone (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (FERAI) (data not shown). In the present study we aimed to investigate the immunomodulatory potential of FERA I chalcone in murine macrophages and lymphocytes and its anti-inflammatory potential in experimental model of paw edema.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male 4- to 6-weeks old BALB/c mice were used. All mice were raised and maintained at the animal facilities of the Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil, in rooms with controlled temperature (22 ± 2 °C) and humidity ($55 \pm 10\%$) and continuous air renovation. Animals were housed in a 12 h light/12 h dark cycle and provided with rodent diet and water *ad libitum*. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Ethics Committee for Animal Experimentation of FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ Permit Number: L-IGM-004/2019)

Drugs

The synthesis of the new chalcone (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one was carried out at the Organic Chemistry Laboratory of the Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products at the Federal University of Paraíba, and was kindly provided to our research group for biological analysis. Briefly, FERAI resulted from a bromination on vanillin, followed by ethylation and aldol condensation. Gentian violet (Synth, São Paulo, SP, Brazil) was used as positive control in cytotoxicity assays. Dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), a synthetic glucocorticoid, was used as a positive control in immunomodulation assays. All compounds were dissolved in DMSO (PanReac, Barcelona, Spain) and diluted in cell culture medium for use in the assays.

Assessment of cytokines and nitric oxide production

Cytokine concentrations in supernatants from J774 macrophage (2×10^5 cells/well) and splenocytes (2×10^5 cells/well) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the DuoSet kit (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. After incubation with a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich), the reaction was developed using H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) and the absorbance at 450 nm wavelength read using a spectrophotometer. Estimation of nitric oxide production was done indirectly through determination of nitrite concentrations in macrophage culture supernatants collected 24 h after incubation, using the Griess method (Green *et al.*, 1982).

Lymphoproliferation

BALB/c mice splenocytes suspension was prepared in DMEM medium supplemented with 10% of FBS and 50 µg/mL of gentamycin and plated in 96-well plates at 1×10^6 cells/well, in triplicate, in the presence of Con A (2 µg/mL, Sigma-Aldrich). Activated splenocytes were incubated in the absence or presence of FERAI (10 – 1,25 µM) or dexamethasone at 0,5 µM, as reference drug. After 72 h of incubation, the plate was centrifuged for 5 minutes at 1500rpm, the supernatant was removed and 100 µL was added of medium with the CellTiter® reagent to each well and taken for reading in the luminescence reader (FilterMax F3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, San Jose, USA). The analysis was performed using the GraphPad Prism version 9 program (Graph Pad Software, San Diego, CA).

Paw Edema and Histopathological Analysis

BALB/C mice were stimulated with 2% carrageenan (final volume of 20 µL/animal) in the subplantar region of the hind paws. Treatment was started 4 hours after the stimulus and continued daily with the compound (1% topical formulation) or vehicle (group treated with base cream without active ingredient). Paw thickness was monitored with the aid of a caliper before the stimulus (time 0) and after 4, 24, 48 and 72 hours.

Inflamed paws from BALB/C mice were collected after euthanasia of these animals and fixed in a 10% formaldehyde solution for 48 hours. Tissue fragments were embedded in paraffin and sections (3-5µm thick) were obtained and stained with conventional hematoxylin and eosin and analyzed by optical microscopy (Guimarães *et al.*, 2009).

Statistical Analyses

The one-way ANOVA test followed by the Bonferroni multiple comparisons post-test were used to determine the statistical significance of comparisons between groups in *in vitro* studies. The results were considered statistically significant when the p value < 0.05. All analyzes were performed using GraphPad Prism version 9 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

RESULTS

FERAI presents low cytotoxicity, modulates the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in activated macrophages and lymphocytes and reduces lymphocyte proliferation.

FERAI had a CC_{50} value of 57.63 ± 11.84 , demonstrating low cytotoxicity for murine macrophages when compared to gentian violet (CC_{50} of 0.7 ± 0.09) and dexamethasone ($CC_{50} = 33.83 \pm 0.13$), one of the reference glucocorticoids in the treatment of immune-mediated diseases. Subsequently, the effect of FERA I on the production of nitrite, cytokines by activated macrophages was evaluated. FERA I reduced TNF- α production after 4 hours of treatment (Figure 1A). Furthermore, FERA I decreased IL-1 β , IL-10 and NO production at all concentrations tested after 24 hours of treatment (Figures 1B, 1E and 1F). At this same time, IL-6 and IL-12 production were significantly reduced only at the highest concentration tested (10 μ M) (Figures 1C and 1D). The influence of FERA I on proliferation and cytokine production by murine splenocytes was also evaluated. This molecule suppressed the lymphocyte proliferative response in a concentration-dependent matter (Figure 1I). Corroborating this result, FERA I significantly reduced the production of cytokine associated with lymphocyte proliferation, IL-2 (Figure 1H). Furthermore, FERA I reduced the production of IFN- γ by activated lymphocytes (Figure 1G). Dexamethasone had an inhibitory effect on lymphoproliferation and cytokine production, even at a concentration of 0.05 μ M (Figure 1).

FERAI reduces carrageenan-induced paw edema

Based on the promising results observed in in vitro assays, the potential of FERA I to modulate inflammation in BALB/c mice was evaluated. For this purpose, carrageenan was injected into the subplantar region of the hind legs, triggering an inflammatory reaction in the area with the formation of edema. The groups of mice were treated daily with the compound (1% topical formulation) or with the base cream without active ingredient (vehicle). As seen in figure 2, FERA I significantly reduced the size of paw edema when compared to mice administered only the vehicle, especially at 4 and 72 hours. Histopathological changes also correlated with lesion progression. Mice administered vehicle alone had an intense inflammatory infiltrate containing macrophages and lymphocytes, with extensive areas of edema (Figure 2B). After treatment with

FERAI, the mice had more organized tissue and a smaller area of edema, despite the presence of the same cell types (Figure 2C).

Discussion

Halogen elements, in recent years, have been incorporated into the development of new drugs. In the structure-activity relationship, halogens are mainly used to increase membrane permeability and increase half-life, which can impact target selectivity and lipophilicity (Inspired; Marine; Space, 2017). The presence of the bromine molecule in FERAI may have optimized the immunomodulatory potential of FERAI.

Cytotoxicity is an initial parameter to evaluate the activity of chemical substances to cause or not damage to cells and tissues. Mello and colleagues (2014) observed non-cytotoxic activity of different chalcones with a CC_{50} value greater than $199\mu\text{M}$ for murine macrophages. In the literature it is also described that chalcones are less cytotoxic in other cell lineages such as A549 (lung adenocarcinoma epithelial cells), A498 (human kidney cancer cells), HeLa (cervical cancer cells), C375 (melanoma cells), HepG2 (hepatocellular carcinoma cells) (de Mello *et al.*, 2014), corroborating the data observed in tests with FERAI.

Cytokines are known to play key roles during macrophage inflammation. There is an association between high levels of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6 with acute pancreatitis (Staubli; Oertli; Nebiker, 2015) and an increased risk of lethality in SARS-COV-2 infection (Del Valle *et al.*, 2020). Increased production of $\text{IL-1}\beta$ and $\text{TNF-}\alpha$ is observed in cases of chronic prostatitis and gouty arthritis, causing damage to joint tissue (Ho *et al.*, 2020). Although IL-4 and IL-10 are anti-inflammatory cytokines, studies show that both can be harmful in cases of active eosinophilic esophagitis (Hirano *et al.*, 2020) and spinal tuberculosis in rabbits (Zhao; Jiao; Wang, 2020), respectively. Moreover, reduced activation and proliferation of T lymphocytes plays a crucial role in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases, viral infections, and transplant and tumor rejection. Activated T lymphocytes initiate the production of $\text{IFN-}\gamma$ and this cytokine induces production of other pro-inflammatory cytokines by macrophages. $\text{IFN-}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$ potentiates inflammation (Platanias, 2005). In our study, the modulation of these cytokines by FERAI provides directions for future studies and becomes crucial for the development of a protective response in different diseases.

The induction of paw edema by carrageenan is widely used to evaluate anti-inflammatory activity. Carrageenan is an oily agent with irritating action, causing damage to the injected site. After the first few hours, histamine and bradykinin are released, which leads to a chain reaction such as dilation of blood vessels, increased vascular permeability and plasma fluid extravasation, causing edema. Leukocyte diapedesis then occurs, increasing the number of

macrophages in the tissue, which leads to an increase in the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), exacerbating inflammation (Winter; Risley; Nuss, 1962).

Calimag and collaborators used this methodology to observe the role of stingless bee propolis from the Philippines in acute inflammation. Propolis is enriched in flavonoids and phenolic acids, which made it capable of attenuating paw edema caused by carrageenan and serum levels of TNF- α (Calimag *et al.*, 2021), corroborating with our results. In another study, chalcone TQ was capable of reducing paw edema by 54% (De León *et al.*, 2003). Pinheiro-Ribeiro and collaborators analyzed that HMC reduced paw edema induced by carrageenan within 1-5 hours at concentrations of 30 and 100mg/kg (Pinho-Ribeiro *et al.*, 2015).

Conclusion

The present study demonstrates that FERAI has important immunosuppressive and anti-inflammatory activity, inhibiting the proliferation of lymphocytes and the secretion of cytokines by murine lymphocytes and macrophages *in vitro* and modulating tissue changes in response to paw edema in an *in vivo* experimental model.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq and CAPES.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCIA

AHAMADA, Mariame Mohamed; JIA, Yang; WU, Xiaochuan. Macrophage Polarization and Plasticity in Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. December, p. 1–12, 2021.

ATIQUI, Sadaf *et al.* Immunogenicity of TNF-Inhibitors. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. February, p. 1–13, 2020.

BARFOD, Lea *et al.* Chalcones from Chinese liquorice inhibit proliferation of T cells and production of cytokines. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 545–555, 2002.

BARRETT, Tessa J. Macrophages in Atherosclerosis Regression. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 20–33, 2020. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.119.312802>.

BHOJ, Priyanka *et al.* Immunomodulatory Activity of Sulfonamide Chalcone Compounds in Mice Infected with Filarial Parasite, *Brugia malayi*. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 225–229, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0727-5>.

BRENNER, Dirk; BLASER, Heiko; MAK, Tak W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: Live or let die. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 362–374, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3834>.

BRODERICK, Lori; HOFFMAN, Hal M. IL-1 and autoinflammatory disease: biology, pathogenesis and therapeutic targeting. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 448–463, 2022.

BULLOCK, Jacqueline *et al.* Rheumatoid arthritis: A brief overview of the treatment. **Medical Principles and Practice**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 501–507, 2019.

BURMAOGLU, Serdar *et al.* Design, synthesis and antiproliferative activity evaluation of fluorine-containing chalcone derivatives. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 3525–3550, 2022.

CAIN, Derek W.; CIDLOWSKI, John A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature**

Reviews Immunology, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192415>.

CALIMAG, Katrina Paz D. *et al.* Attenuation of carrageenan-induced hind paw edema and plasma $\text{tnf-}\alpha$ level by philippine stingless bee (*Tetragonula biroi friese*) propolis. **Experimental Animals**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 185–193, 2021.

DA SILVA, Juliana Cruz *et al.* Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. **Clinics**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 766–771, 2013.

DE LEÓN, E. J. *et al.* 1-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)-3-(3-(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivative with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 246–257, 2003.

DE MELLO, Tatiane F.P. *et al.* Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 27–34, 2014.

DEL VALLE, Diane Marie *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature medicine**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32839624>.

FAUCI, Anthony S.; MOUTSOPOULOS, Haralampos M. Polyclonally triggered B cells in the peripheral blood and bone marrow of normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus and primary sjögren's syndrome. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 577–584, 1981.

FUSTER, José J. *et al.* Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 254–264, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/cvr/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvp363>.

GAO, Xiaohua *et al.* Immunomodulatory activity of xanthohumol: Inhibition of T cell proliferation, cell-mediated cytotoxicity and Th1 cytokine production through suppression of NF- κ B. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 477–484, 2009.

GHRIBIA, Lotfi *et al.* Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of extracts and

secondary metabolites from *Acacia cyanophylla*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 4, n. Suppl 1, p. S417–S423, 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S222116911530304X>.

GINHOUX, Florent; JUNG, Steffen. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3671>.

GOMES, Marcelo N. *et al.* Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 8, 2017.

GORONZY, Jörg J.; WEYAND, Cornelia M. Rheumatoid arthritis. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 204, p. 55–73, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790350>.

GOSCH, Christian *et al.* Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). **Plant Science**, [s. l.], v. 176, n. 2, p. 223–231, 2009.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUILLIAMS, Martin; MILDNER, Alexander; YONA, Simon. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 595–613, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>.

GUIMARÃES, Elisalva T. *et al.* Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 84–87, 2009.

HIRANO, Ikuo *et al.* Efficacy of Dupilumab in a Phase 2 Randomized Trial of Adults With Active Eosinophilic Esophagitis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 111-122.e10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.09.042>.

HIRANO, T. *et al.* Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 228–231, 1987.

HO, Dong-Ru *et al.* Beneficial Effects of Inflammatory Cytokine-Targeting Aptamers in an Animal Model of Chronic Prostatitis. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v.

21, n. 11, p. 111-122.e10, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32486412>.

HU, Xiaoyu; IVASHKIV, Lionel B. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- γ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. **Immunity**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 539–550, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833085>.

IJIMA, Yoko *et al.* Metabolite profiling of chalcones and flavanones in tomato fruit. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 94–102, 2008.

INSPIRED, Marine; MARINE, Uniquely; SPACE, Chemical. Marine Inspired as Modulators of Serotonin Receptors : An Example Illustrating the Power of Bromine as Part of the. [s. l.], p. 1–14, 2017.

ITALIANI, Paola; BORASCHI, Diana. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 5, n. OCT, p. 1–22, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00514/abstract>.

IWASZKO, Milena; BIAŁY, Sylwia; BOGUNIA-KUBIK, Katarzyna. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3000, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34831223>.

JANG, Dan In *et al.* The role of tumor necrosis factor alpha (Tnf- α) in autoimmune disease and current tnf- α inhibitors in therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 1–16, 2021.

JANG, Sunhee; KWON, Eui Jong; LEE, Jennifer Jooha. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, 2022.

JASIM, Hiba A. *et al.* Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 8, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34439870>.

KIM, Kil-Nam *et al.* Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7

macrophages. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, [s. l.], v. 53, p. 371–5, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.021>.

KIRIAKIDOU, Marianthi; CHING, Cathy Lee. Systemic Lupus Erythematosus. **Annals of internal medicine**, [s. l.], v. 172, n. 11, p. ITC81–ITC96, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32479157>.

KOELWYN, Graeme J. *et al.* Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 526–537, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41590-018-0113-3>.

KUHN, Annegret; RULAND, Vincent; BONSMANN, Gisela. Cutaneous lupus erythematosus: Update of therapeutic options: Part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. e195–e213, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2010.06.017>.

KWAK, Kihyuck; AKKAYA, Munir; PIERCE, Susan K. B cell signaling in context. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 963–969, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-019-0427-9>.

LEE, Jian Sian; BUKHARI, Syed Nasir Abbas; FAUZI, Norsyahida Mohd. Effects of chalcone derivatives on players of the immune system. **Drug design, development and therapy**, [s. l.], v. 9, p. 4761–78, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26316713>.

LEE, Dennis S.W.; ROJAS, Olga L.; GOMMERMAN, Jennifer L. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 179–199, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-00092-2>.

LETAFAT, Bahram *et al.* **Synthesis and In vitro Cytotoxic Activity of Novel Chalcone-like Agents** *Iran J Basic Med Sci*. [S. l.: s. n.], 2013.

LI, Shiming; LO, Chih-Yu; HO, Chi-Tang. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 12, p. 4176–85, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16756344>.

LIN, Chien-Tsong *et al.* Anti-inflammatory activity of Flavokawain B from *Alpinia pricei* Hayata. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 57, n. 14, p. 6060–5, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19537711>.

LIU, Dora *et al.* A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 30, 2013. Disponível em: Allergy, Asthma & Clinical Immunology.

LIU, Yan-Cun *et al.* Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International journal of biological sciences**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 520–9, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910531>.

LORUSSO, Vito; MARECH, Ilaria. Novel plant-derived target drugs: A step forward from licorice?. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 333–335, 2013.

LOZA, Matthew J. *et al.* Assembly of Inflammation-Related Genes for Pathway-Focused Genetic Analysis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. e1035, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940599>.

MARTINEZ, Fernando O.; HELMING, Laura; GORDON, Siamon. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 27, p. 451–483, 2009.

MOUSSET, Charlotte M. *et al.* Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. **Cytometry Part A**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 647–654, 2019.

MUELLER, Anna-Lena *et al.* Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3017, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34831240>.

MUKHERJEE, Sitabja *et al.* Oral Therapy Using a Combination of Nanotized Antimalarials and Immunomodulatory Molecules Reduces Inflammation and Prevents Parasite Induced Pathology in the Brain and Spleen of *P. berghei* ANKA Infected C57BL/6 Mice. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. January, p. 1–17, 2022.

MURRAY, Peter J.; WYNN, Thomas A. Protective and pathogenic functions of macrophage

subsets. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27455818>.

NETEA, Mihai G. *et al.* Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 13–26, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>.

NOURBAKSH, Mitra *et al.* Attenuation of Inflammatory Responses in Breast and Ovarian Cancer Cells by a Novel Chalcone Derivative and Its Increased Potency by Curcumin. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2023, 2023.

O'BRIEN, John *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OKON, L. G.; WERTH, V. P. Cutaneous lupus erythematosus: Issues in diagnosis and treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 365–381, 2009. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=2009554096>.

OTERO, Elver *et al.* Synthesis, leishmanicidal and Cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 13251–13266, 2014.

PAN, Lu *et al.* Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. **World journal of pediatrics : WJP**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 19–30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12519-019-00229-3>.

PARK, Pil Hoon *et al.* KB-34, a newly synthesized chalcone derivative, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages via heme oxygenase-1 induction and blockade of activator protein-1. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 606, n. 1–3, p. 215–224, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.12.034>.

PERS, Jacques Olivier *et al.* BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1050, n. 33,

p. 34–39, 2005.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A. *et al.* Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 228, p. 88–99, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.011>.

PLATANIAS, Leonidas C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 375–386, 2005.

PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, [s. l.], v. 302, p. 2–22, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>.

REINA-CAMPOS, Miguel; SCHARPING, Nicole E.; GOLDRATH, Ananda W. CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 718–738, 2021.

RINCÓN, Mercedes *et al.* Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 185, n. 3, p. 461–469, 1997.

ROCHAS, Caroline *et al.* Transmembrane BAFF from rheumatoid synoviocytes requires interleukin-6 to induce the expression of recombination-activating gene in B lymphocytes. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 1261–1271, 2009.

RODRIGUES, Danilo *et al.* Trypanocidal Activity of Flavokawin B, a Component of *Polygonum ferrugineum* Wedd. **Planta Medica**, [s. l.], v. 83, n. 03/04, p. 239–244, 2016. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-112031>.

ROE, Kevin. An inflammation classification system using cytokine parameters. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 6–10, 2021.

RUSSO, Lucia; LUMENG, Carey N. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. **Immunology**, [s. l.], v. 155, n. 4, p. 407–417, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.13002>.

SARAIVA, Margarida *et al.* Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 217, n. 1, p. 1–19, 2020.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.26429>.

SLIMESTAD, Rune; VERHEUL, Michel. Properties of chalconaringenin and rutin isolated from cherry tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 3180–3185, 2011.

STAUBLI, Sebastian Manuel; OERTLI, Daniel; NEBIKER, Christian Andreas. Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 273–83, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/10408363.2015.1051659>.

SUMIYOSHI, Maho *et al.* Antitumor and antimetastatic actions of xanthoangelol and 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots through the inhibited activation and differentiation of M2 macrophages. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 22, n. 7–8, p. 759–767, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.05.005>.

SWIRSKI, Filip K.; NAHRENDORF, Matthias. Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. **Science**, [s. l.], v. 339, n. 6116, p. 161–166, 2013. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1230719>.

TABAS, Ira; LICHTMAN, Andrew H. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. **Immunity**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 621–634, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317304193>.

UCHIUMI, Fumiaki *et al.* Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. **Antiviral research**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 89–98, 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354202001869>.

VIGNALI, Dario A A; KUCHROO, Vijay K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 722–728, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22814351>.

VILLARINO, Alejandro V; KANNO, Yuka; O'SHEA, John J. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. **Nature immunology**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 374–384, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.3691>.

WANG, Danni *et al.* Natural Chalcones in Chinese Materia Medica: Licorice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2020, 2020.

WANG, Xiaoting *et al.* Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. a028548, 2019. Disponível em: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a028548>.

WILLS-KARP, Marsha. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 9–18, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11149983>.

WINTER, Chareles A; RISLEY, Edwin A; NUSS, George W. Carrageenin-induced edema in hind paw. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 111, p. 544–547, 1962.

YADAV, Vivek R. *et al.* The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 295–309, 2011.

YAO, Yongli; XU, Xiang-Hong; JIN, Liping. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. MAR, p. 792, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31037072>.

YATIM, Karim M; LAKKIS, Fadi G. A brief journey through the immune system. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1274–81, 2015. Disponível em: <https://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.10031014>.

YOUINOU, Pierre; SARAUX, Alain; PERS, Jacques-Olivier. B-Lymphocytes Govern the Pathogenesis of Sjogren's Syndrome. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 2071–2077, 2012.

ZAMPINI, Iris C.; VATTUONE, Marta A.; ISLA, Maria I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 450–6, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874105004617>.

ZARGHI, Afshin; ARFAEI, Sara. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 655–83, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3813081/pdf/ijpr-10->

655.pdf%0Ahttps://www.semanticscholar.org/paper/Selective-COX-2-Inhibitors%3A-A-Review-of-Their-Zarghi-Arfaei/83b076e75f4b75e46181d19873b9fb261c1341ce%0Ahttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/arti.

ZHAO, Yi; JIAO, Yong; WANG, Lei. Hesperidin methyl chalcone alleviates spinal tuberculosis in New Zealand white rabbits by suppressing immune responses. **The journal of spinal cord medicine**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 532–539, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30124375>.

ZHOU, Xiujuan *et al.* Interleukin-2 (IL-2) Interacts With IL-2 Receptor Beta (IL-2R β): Its Potential to Enhance the Proliferation of CD4+ T Lymphocytes in Flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 11, n. September, p. 531785, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33013923>.

ZHOU, Sheng; LU, Hongcheng; XIONG, Min. Identifying Immune Cell Infiltration and Effective Diagnostic Biomarkers in Rheumatoid Arthritis by Bioinformatics Analysis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. August, p. 1–13, 2021.

Figure legends

Figure 1: FERAI inhibits nitric oxide, cytokines production by activated macrophages and lymphocytes, and lymphoproliferation. TNF- α dosage after 4 hours of treatment (A) and IL-1 β (B); IL-6 (C); IL-12 (D); IL-10 (E); NO (F); IFN- γ (G); IL-2; (H) dosages after 24 hours of treatment. Lymphocyte proliferation was assessed after 72 hours of treatment. Values represent the means \pm SEM of three determinations ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$).

Figure 2: FERAI reduces carrageenan-induced paw edema. (A) Edema was induced by subplantar injection of 0.2mL of 1% carrageenan into the right hind paw of the BALB/c mouse. Groups of mice were treated with FERAI 1% topical formulation after 4 hours of edema induction. The vehicle refers to the group treated only with the base cream. The control group refers to mice without edema and treatment. $*P < 0,05$ and $**P < 0,01$ compared vehicle to FERAI treated group. After 72 hours of treatment, paws were removed and fixed with formaldehyde solution (10%). Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and observed under light microscopy, x400. (B) Non-treated mice; (C) Vehicle-treated mice; (D) Mice treated with FERAI.

Figures

FIGURE 1:

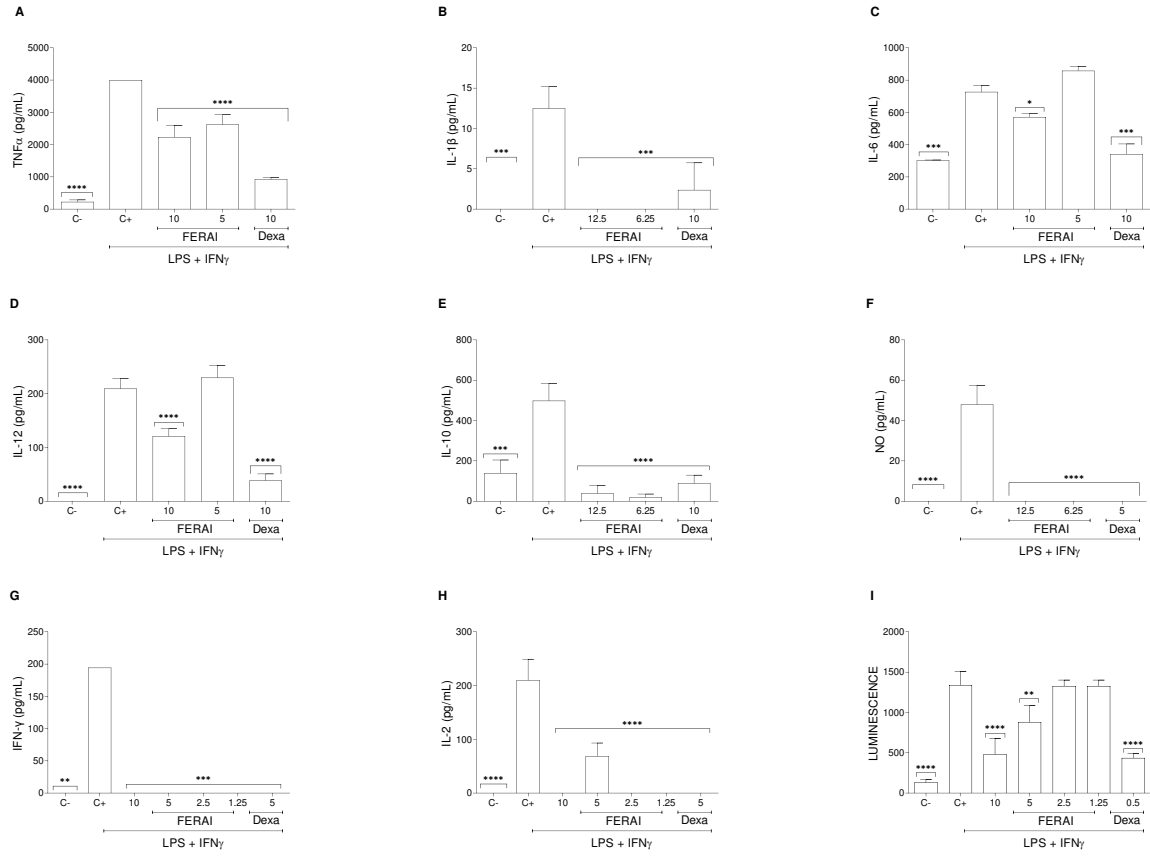


FIGURE 2:

