



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE CULTURA MACRÓFAGICA TRATADA COM ÁCIDO
KÓJICO**

HEYDER COUTINHO ALMEIDA

Belém
2025

Heyder Coutinho Almeida

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE CULTURA MACRÓFAGICA TRATADA COM ÁCIDO
KÓJICO**

Defesa de **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, da Universidade Federal do Pará - UFPA, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Agenor Valadares Santos

Belém
2025

FOLHA DE APROVAÇÃO

Heyder Coutinho Almeida

ANÁLISE PROTEÔMICA DE CULTURA MACRÓFAGICA TRATADA COM ÁCIDO KÓJICO

Defesa de Dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 17/ 07 / 2023

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Luís Adriano Santos do Nascimento
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
Universidade Federal do Pará

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade de cursar o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao Instituto de Ciências Biológicas, onde esta dissertação foi desenvolvida, e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, com especial agradecimento aos docentes e técnicos pelo apoio essencial ao longo desta trajetória.

Aos colegas e amigos do Instituto de Ciências Biológicas, tanto técnicos quanto professores, pelo incentivo e suporte em diversos momentos.

Ao Coordenador do Curso, Professor Dr. Luis Adriano, pela compreensão e flexibilidade ao longo desse percurso.

Ao Diretor José Ricardo Vieira, pelo apoio incondicional e por acreditar no meu trabalho.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações (LABEB) e ao Laboratório de Proteômica (LProt) da UFPA, pela disponibilização da infraestrutura, equipamentos e suporte técnico fundamentais para a realização deste estudo.

Ao Professor Dr. Agenor Valadares Santos, pela orientação precisa, pelo comprometimento e por todo o auxílio prestado durante a elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, por seu amor incondicional e apoio silencioso, que sempre me fortaleceram ao longo desta caminhada.

Ao meu grande amigo e irmão, Rafael Fernandes, cuja presença e incentivo foram essenciais em momentos desafiadores, desde o início até a conclusão desta etapa.

À minha esposa, companheira incansável, que me deu forças nos momentos mais difíceis e esteve ao meu lado, motivando-me em cada passo desta jornada.

E, acima de tudo, a Deus, que me guiou, fortaleceu e esteve comigo em cada desafio, renovando minha fé e determinação.

Salmos 18:2

O SENHOR é o meu penhasco e minha fortaleza, quem me liberta é o meu Deus. Nele me abrigo; meu rochedo, meu escudo e o poder que me salva, minha torre forte e meu refúgio.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Ácido kójico	12
1.2 O sistema imune	13
1.3 Ácido kójico e o sistema imune	14
1.4 Proteômica	16
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 METODOLOGIA	19
4.1 Cultura de macrófagos j774a.1	19
4.2 Cultura de macrófagos j774a.1	20
4.3 Tratamento com ácido kójico	20
4.4 Análise da morfologia celular após tratamento	21
4.5 Extração de proteínas, digestão proteica e lc-ms/ms	21
4.6 Identificação das proteínas e análise dos dados	22
4.6.1 MassLynx	22
4.6.2 PLGS.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho Esquemático dos Experimentos.	20
Figura 2: Análise quantitativa do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kojico. Diagrama de Venn relacionando o número de proteínas identificadas nas análises proteômicas.	25
Figura 3: Análise das funções moleculares do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kojico.	27
Figura 4: Análise das funções celulares do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kojico.	28
Figura 5: Análise das proteínas envolvidas nos componentes celulares do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kójico.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas expressas em macrófagos tratados com Ácido Kójico (50 e 100 μM).	26
--	-----------

RESUMO

O ácido kójico (AK) é um metabólito secundário fúngico natural, produzido por algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*, através da biotransformação direta de substratos de carbono como glicose, sucralose, etanol entre outros. O AK foi isolado originalmente no Japão, em 1907, a partir de micélios de *Aspergillus oryzae*, é utilizado na indústria cosmética na forma de géis e sabonete é utilizado para obter o efeito de clareamento da pele inibindo a enzima tirosinase, reduzindo a produção de formação de melanina, também bloqueia a formação de pigmentação e uniformiza o tom da pele. Também é aplicado como um aditivo alimentar para a prevenção de escurecimento enzimático, pois é um quelante de metais e um potente antioxidante. Embora o AK tenha inúmeras funções biológicas, apenas recentemente estudos sobre a proliferação *in vitro* e citotoxicidade foram relatadas, mas ainda de forma limitada quanto ao seu efeito nas células imunes. Os macrófagos estão entre as células de defesa mais importantes que especificamente reconhecem e respondem a corpos estranhos, apoptose células e patógenos. Através de processo de ativação, há uma maior proliferação de macrófagos, que sofrem várias alterações morfológicas, como um aumento nas habilidades de disseminação e adesão, atividade de fagocitose, geração de ROS, apresentação de antígeno e produção de citocinas. De acordo com a classificação das funções biológicas, nossos resultados revelaram que em ambas as concentrações de ácido Kójico, as 14 proteínas expressas possuem função predita relacionada a processos do ciclo celular e oxirredução.

Palavras Chaves: Ácido Kójico, Sistema Imune, Citotoxicidade, Ciclo Celular

ABSTRACT

Kojic acid (AK) is a natural fungal secondary metabolite, produced by some species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Acetobacter*, through the direct biotransformation of carbon substrates such as glucose, sucralose, ethanol, among others. AK was originally isolated in Japan, in 1907, from *Aspergillus oryzae* mycelia, it is used in the cosmetic industry in the form of gels and soap and is used to obtain the effect of whitening the skin by inhibiting the enzyme tyrosinase, reducing the production of formation of melanin, it also blocks the formation of pigmentation and evens out the skin tone. It is also applied as a food additive for the prevention of enzymatic browning, as it is a metal chelator and a potent antioxidant. Although AK has numerous biological functions, only recently studies on in vitro proliferation and cytotoxicity have been reported, but still limitedly regarding its effect on immune cells. Macrophages are among the most important defense cells that specifically recognize and respond to foreign bodies, apoptosis cells and pathogens. Through the activation process, there is an increased proliferation of macrophages, which undergo various morphological changes, such as an increase in dissemination and adhesion abilities, phagocytosis activity, ROS generation, antigen presentation and cytokine production. According to the classification of biological functions, our results revealed that in both Kojic acid concentrations, the 14 expressed proteins have a predicted function related to cell cycle and redox processes.

Keywords: Kojic Acid, Immune System, Cytotoxicity, Cell Cycle

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ácido kójico

O ácido kójico (AK), 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4H-piran-4-ona, é um metabólito secundário fúngico natural, produzido por algumas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*, através da biotransformação direta de substratos de carbono como glicose, sucralose, etanol entre outros (El-sharkawy, 1995; Kwak; Rhee, 1992; Saeedi, 2019). O AK foi isolado originalmente no Japão, em 1907, a partir de micélios de *Aspergillus oryzae* a partir da fermentação aeróbica, sendo sintetizado a partir de carboidratos e tem como característica aspecto transparente e cristalino, massa molar de 142.1 g.mol^{-1} , ponto de fusão entre $151 - 154^{\circ}\text{C}$ e pode ser facilmente dissolvido em água, etanol e acetona (Kwak; Rhee, 1992; Uchin, 1988; Saeedi, 2019).

O ácido kójico é conhecido por sua capacidade de inibir a tirosinase, a enzima que catalisa a primeira etapa da síntese de melanina na pele. A inibição da tirosinase leva à redução da produção de melanina, o que pode ser utilizado para clarear manchas de pele e tratar problemas de hiperpigmentação. Além disso, o ácido kójico possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas que o tornam útil na produção de alimentos e como conservante natural. (Cherdchom *et al.*, 2021; Saeedi, 2019; Zachary, 2020).

A atividade antioxidante do ácido kójico ocorre pela inibição da produção de radicais livres e redução do estresse oxidativo. Essa atividade pode ser atribuída à presença de grupos hidroxila em sua estrutura química, que permitem a ligação com os radicais livres e inibição de sua ação nociva. Essa propriedade torna o ácido kójico um agente eficaz na prevenção do envelhecimento celular e na proteção contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo; já a sua atividade antimicrobiana é devido à sua capacidade de inibir a síntese de DNA, proteínas e membranas celulares de micro-organismos. Essa propriedade faz com que o ácido kójico seja utilizado na produção de alimentos e como conservante natural em produtos cosméticos e farmacêuticos.

Além disso, o ácido kójico tem sido estudado por seu potencial aplicação em outras áreas, como na síntese de novos compostos orgânicos e na produção de biocombustíveis. A sua capacidade de ser produzido a partir de diversos substratos vegetais e sua alta eficiência na inibição da tirosinase e na atividade antioxidante e

antimicrobiana tornam o ácido fólico uma substância com grande potencial de utilização em diversas áreas.

Embora o AK tenha inúmeras funções biológicas, apenas recentemente estudos sobre a proliferação *in vitro* e citotoxicidade foram relatadas, mas ainda de forma limitada quanto ao seu efeito nas células imunes, sabe-se que promove um aumento da fagocitose, da concentração de cálcio dos neutrófilos e da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em neutrófilos, mas conhecimento sobre os efeitos em macrófagos são ainda mais limitados (Cherdchom, 2021; Khan, 2021).

1.2 O sistema imune

O sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo contra patógenos e substâncias estranhas, além de ter um papel importante na regulação de processos fisiológicos como a resposta inflamatória e a cicatrização de tecidos. O sistema imunológico é composto por diferentes tipos de células, moléculas e órgãos, que trabalham de forma coordenada para proteger o organismo contra ameaças externas.

Dentre as células do sistema imunológico, os macrófagos são uma das principais células do sistema imunológico inato. Os macrófagos são células fagocitárias, capazes de capturar e destruir microrganismos e outras partículas estranhas, além de apresentar antígenos para as células do sistema imunológico adaptativo. Os macrófagos também têm um papel importante na regulação da resposta inflamatória, atuando na produção de citocinas e outros mediadores que regulam a resposta inflamatória.

Os macrófagos são produzidos na medula óssea a partir de precursores mieloides, e são encontrados em diferentes tecidos do organismo, incluindo o fígado, os pulmões, o baço e os tecidos linfoides. Os macrófagos podem ser ativados por diferentes estímulos, como a presença de microrganismos, partículas estranhas, citocinas e outros mediadores da resposta inflamatória. A ativação dos macrófagos resulta em mudanças em sua morfologia, atividade fagocítica, produção de citocinas e outras moléculas.

Os macrófagos são capazes de reconhecer diferentes tipos de microrganismos e partículas estranhas através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs são moléculas que reconhecem padrões moleculares associados a

patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Os PRRs incluem receptores para lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, ácidos nucleicos, proteínas e outros componentes de microrganismos e células danificadas.

A ativação dos macrófagos resulta na produção de citocinas, quimiocinas e outras moléculas que recrutam outras células do sistema imunológico para o local da infecção ou do dano tecidual. As citocinas produzidas pelos macrófagos incluem interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) e outras moléculas que regulam a resposta inflamatória e a imunidade adaptativa. As quimiocinas produzidas pelos macrófagos incluem quimiocina (C-C) ligante 2 (CCL2), quimiocina (C-X-C) ligante 8 (CXCL8) e outras moléculas que recrutam neutrófilos, células T e outras células do sistema imunológico para o local da infecção ou do dano tecidual.

Além disso, os macrófagos também desempenham um papel importante na resposta inflamatória. Quando ocorre uma infecção ou lesão tecidual, os macrófagos são ativados e começam a secretar mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, que atraem outras células do sistema imune para o local da inflamação. Eles também podem fagocitar microrganismos e restos celulares, ajudando a limpar a área infectada ou lesionada.

No entanto, a ativação excessiva dos macrófagos pode levar a danos teciduais e inflamação crônica, contribuindo para várias doenças inflamatórias, como artrite, doenças cardiovasculares e distúrbios autoimunes. Portanto, é importante entender os mecanismos que regulam a ativação dos macrófagos e encontrar maneiras de controlá-los para prevenir ou tratar essas doenças.

1.3 Ácido kójico e o sistema imune

O ácido kójico é um composto orgânico natural amplamente utilizado na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. No entanto, estudos recentes têm mostrado que o ácido kójico também pode ter efeitos imunomodulatórios, em particular no sistema imunológico inato. Esse sistema é composto por células imunes que desempenham um papel importante na defesa do organismo contra patógenos, incluindo os macrófagos.

Os macrófagos são células do sistema imunológico inato responsáveis por fagocitar e destruir patógenos, além de desempenhar um papel importante na regulação da resposta imune adaptativa. O ácido fólico tem sido estudado por sua capacidade de modular a atividade dos macrófagos, principalmente através da sua ação como antioxidante.

Estudos *in vitro* têm mostrado que o ácido fólico pode aumentar a atividade fagocítica dos macrófagos, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6). Além disso, o ácido fólico tem demonstrado ser capaz de aumentar a expressão de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) nos macrófagos, tais como o receptor Toll-like 4 (TLR4), o que pode levar a uma maior capacidade dos macrófagos em reconhecer e responder a patógenos.

No entanto, outros estudos têm mostrado que o ácido fólico também pode ter efeitos anti-inflamatórios em células do sistema imunológico. Em um estudo em camundongos com colite, o ácido fólico foi capaz de reduzir a inflamação intestinal e a produção de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que aumentou a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10). Esses resultados sugerem que o ácido fólico pode ter um efeito regulatório sobre a resposta imune, reduzindo a inflamação excessiva e promovendo uma resposta mais equilibrada.

Em relação aos macrófagos, o ácido fólico também tem sido estudado em contextos específicos, como na avaliação dos efeitos da substância na produção proteica dessas células. Em um estudo recente, macrófagos tratados com ácido fólico apresentaram alterações significativas na expressão de proteínas relacionadas à resposta imune, incluindo citocinas, receptores de membrana e enzimas envolvidas na produção de ROS.

Além disso, o ácido fólico também tem demonstrado capacidade de reduzir a produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS) pelos macrófagos, o que pode ser benéfico em condições em que a produção excessiva de RNS pode levar a danos teciduais e inflamação.

No entanto, é importante destacar que ainda são necessários mais estudos para avaliar os efeitos do ácido fólico em diferentes condições e contextos imunológicos. Além disso, é necessário também investigar a segurança e a eficácia

do uso do ácido fólico em seres humanos, uma vez que muitos dos estudos realizados até o momento foram realizados em modelos animais ou células *in vitro*.

1.4 Proteômica

A análise proteômica é uma ferramenta poderosa para a identificação e quantificação de proteínas presentes em uma amostra biológica. Ela permite a compreensão do proteoma de uma célula, tecido ou organismo, e sua interação com o ambiente em que está inserido. Essa técnica é amplamente utilizada em pesquisas biomédicas, incluindo estudos sobre o sistema imunológico e suas células, como os macrófagos.

Uma das principais vantagens da análise proteômica é a capacidade de identificar proteínas de baixa abundância e post-traduzidas, que muitas vezes são difíceis de detectar por outras técnicas. A técnica é capaz de detectar milhares de proteínas em uma única amostra, permitindo a identificação de proteínas diferencialmente expressas em diferentes condições ou em diferentes tipos celulares. Além disso, a análise proteômica permite a identificação de modificações pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, glicosilação e ubiquitinação, que podem afetar a atividade e a função das proteínas.

A análise proteômica é realizada por meio de várias etapas, incluindo extração de proteínas, separação por eletroforese ou cromatografia, digestão proteolítica, identificação de peptídeos e análise de espectrometria de massa. A espectrometria de massa é a principal técnica utilizada na análise proteômica, permitindo a identificação e quantificação de proteínas com alta sensibilidade e especificidade.

A análise proteômica tem sido amplamente utilizada em estudos sobre macrófagos, uma das principais células do sistema imunológico. Os macrófagos têm a capacidade de fagocitar bactérias, células mortas e outros detritos celulares, e são importantes na resposta imune a infecções. A análise proteômica tem sido usada para identificar proteínas diferencialmente expressas em macrófagos em resposta a diferentes estímulos, como infecções, inflamação e estresse celular. Esses estudos forneceram insights sobre as vias de sinalização e a regulação da expressão gênica que ocorrem em macrófagos em resposta a diferentes estímulos.

A análise proteômica também tem sido utilizada em estudos de macrófagos em doenças, como doenças infecciosas, câncer e doenças autoimunes. A identificação

de proteínas diferencialmente expressas em macrófagos nessas condições pode ajudar a entender os mecanismos subjacentes à doença e identificar possíveis alvos terapêuticos. Além disso, a análise proteômica tem sido usada em estudos de desenvolvimento de drogas, ajudando a identificar proteínas-alvo e a avaliar a eficácia e segurança de novas drogas em macrófagos e outras células.

Uma das principais vantagens da análise proteômica é que ela permite a identificação de proteínas que estão envolvidas em processos celulares específicos, como a resposta imune. Além disso, a análise proteômica pode ser usada para identificar proteínas que são expressas de forma diferencial em diferentes condições, como em células tratadas com drogas ou em células cancerosas.

Uma das principais técnicas utilizadas na análise proteômica é a espectrometria de massa. A espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite a identificação e quantificação de moléculas com base em sua massa e carga. É uma plataforma sensível, identificando apenas 10-15 moles de um composto de 1 kDa, permitindo assim a identificação do composto dentro de misturas complexas. MS ioniza amostras, produzindo um feixe de íons gasosos que são separados de acordo com sua relação massa-carga (m/z) e suas abundâncias registradas (Kang et al., 2012). Ionização por eletrospray (ESI) e dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) são os métodos mais comuns para ionização de peptídeos/proteínas antes da Análise MS, envolvendo a adição ou remoção de um próton (Fenn, 1989; Karas e Hillenkamp, 1988). O acoplamento de ESI a ferramentas de separação baseadas em líquido permite a análise de amostras biológicas complexas, ionizando o analito fora da solução, quando integrado com cromatografia líquida (LC) e sistemas baseados em LC-MS (Peffer et al., 2013). Íons de um certo m/z são geralmente isolados do complexo mistura como uma etapa preliminar antes da fragmentação iônica com maior caracterização via MS tandem (MS/MS) (Savaryn et al., 2016).

Essa técnica pode fornecer informações valiosas sobre a biologia celular e ajudar na identificação de biomarcadores de doenças. A combinação da análise proteômica com outras técnicas, como a espectrometria de massa, pode fornecer informações ainda mais detalhadas sobre as proteínas envolvidas em diferentes processos biológicos.

2 JUSTIFICATIVA

Na literatura existem diversos trabalhos que mostram inúmeras ações biológicas do AK, além de todas estas aplicabilidades já descritas, o AK, parece apresentar ação imunomoduladora, influenciando no crescimento de alguns agentes infecciosos e também age aumentando a imunidade do organismo hospedeiro, ativando células envolvidas na imunidade inata e adquirida, aumentando a fagocitose e induzindo a produção de ROS (Da costa, 2018; Rodrigues, 2014; Schultze; Schmidt, 2015).

O AK também foi capaz de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos, com aumento de tamanho celular, do número de organelas e alteração no padrão de proteínas de superfície (Da Costa et al., 2018), promovendo ativação de macrófagos através do rearranjo do citoesqueleto, aumento da fagocitose e produção de radicais superóxidos, sem causar efeitos citotóxicos em células de mamíferos (Rodrigues et al., 2014).

O AK é amplamente utilizado na indústria cosmética e possui diversas aplicações biológicas (Zachary et al., 2020), porém poucos trabalhos na literatura descreveram a sua ação nas células do sistema imunológico e pouco se sabe sobre a ação do ácido kójico sobre os precursores das células sanguíneas, importante para manter o organismo protegido contra diversos patógenos, já sendo encontrado em diversas patentes e registros como um bacteriostático na utilização em higienizadores para mãos (CN108514533A), utilizando na fertilização de plantas (CN101444229A) com melhora em seu crescimento e produtividade, suplementos alimentares antitumoral para Gliomas (KR20110054448A) entre diversas outras aplicações, sendo as mais encontradas na área do mercado cosmético de clareamento (CN108866119A; FR2460131A1; KR20170011283A).

Este aumento de patentes em outras áreas que se diferem do clareamento de pele também se reflete em um aumento nas publicações em áreas como a atividade antimicrobiana com danos em DNA e membrana celular da bactéria, sua atividade antitumoral que envolve a ativação de vias apoptóticas de células tumorais, além de sua atividade anti-inflamatória e principalmente moduladora do sistema imune (Da Costa, 2018; Khan, 2021), como vem sendo proposto como um medicamento no tratamento da leishmaniose devido a sua capacidade de ativação de macrófagos aumentando sua capacidade fagocítica e citotóxica (Rodrigues et al., 2014).

Desta forma, este projeto busca estudar a interação de macrófagos com o ácido kójico e avaliar as mudanças provocadas nas células através do perfil de expressão

de proteínas e enzimas envolvidas. Esses modelos *in vitro* são de extrema importância para o estudo dessas interações, pois mimetizam as condições que o ácido kójico atua no interior da célula e é de grande importância para a busca por medicamentos naturais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a perfil proteico relacionado a cultura macrófagica tratada com Ácido Kójico.

3.2 Objetivos específicos

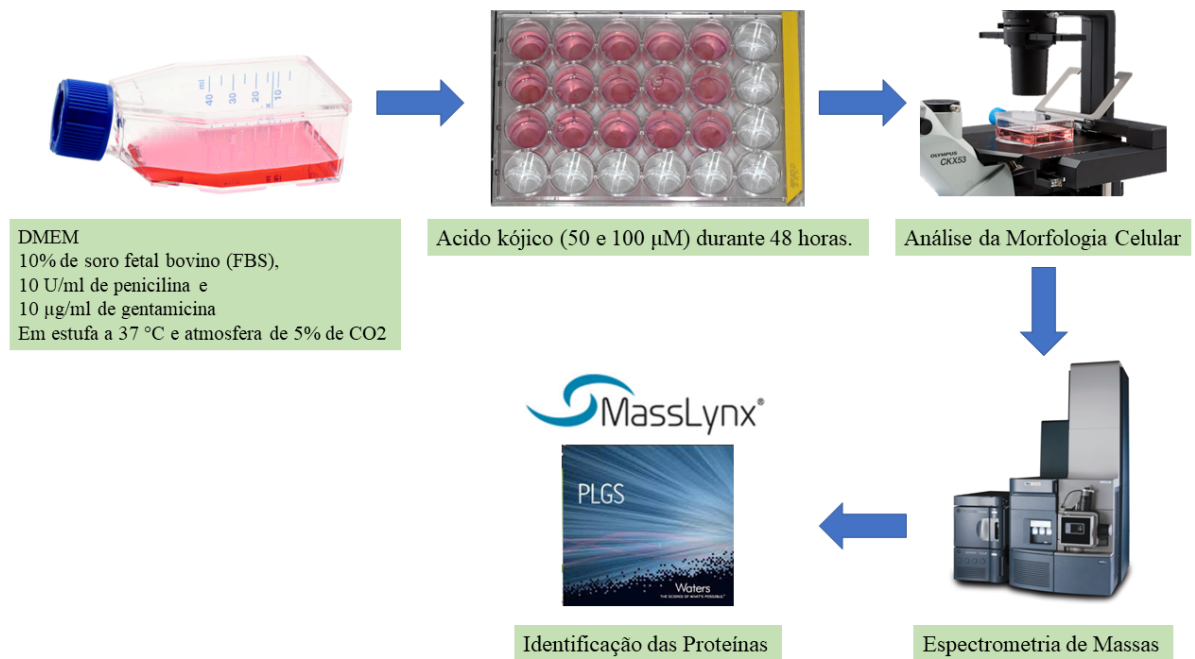
- a. Analisar mudanças morfológicas dos macrófagos após o tratamento com Ácido Kójico;
- b. Adquirir o proteoma dos macrófagos após o tratamento com Ácido Kójico;
- c. Buscar as mudanças no perfil de proteínas relacionadas exposição ao Ácido Kójico.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultura de macrófagos j774a.1

Para a realização desse experimento foram realizadas várias etapas (Figura 1). Teve início com a cultura dos macrófagos até atingir 80-90% de confluência. Em seguida, as células serão tratadas com duas concentrações do ácido kójico (50 e 100 μM) e incubadas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C durante 48 horas. Após o término do tratamento, os macrófagos serão fixados e corados com Giemsa e visualizados em microscópio óptico. Outra parte da cultura tratada será preparada e analisadas pelo LC-MS/MS e os espectros de massa serão analisadas usando *IdentityE* e *Peptide Prophet*.

Figura 1: Desenho Esquemático dos Experimentos.



Fonte: autor, 2022.

4.2 Cultura de macrófagos j774a.1

A linhagem celular J774A.1 (macrófagos de camundongos *Mus musculus*, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro) foi cultivada em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 10 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de gentamicina, em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, até atingir 80-90% de confluência. Para realização dos experimentos, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e dissociadas quimicamente com solução de Tripsina-EDTA 0,05%. Após centrifugação (1500 rpm, 3 minutos), o pellet foi ressuscitado em meio de cultura e as células contadas em câmara de Neubauer, havendo ajuste na densidade de acordo com o número de células utilizadas em cada experimento.

4.3 Tratamento com ácido kójico

Para a avaliação da atividade microbicida dos macrófagos, fora utilizado o protocolo descrito por Anes et al., (2006) com algumas modificações. Um total de $0,5 \times 10^5$ macrófagos/poço foram transferidos para uma placa de 24 poços, onde permanecerão em aderência por 48 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com duas concentrações do ácido kójico (50 e 100 µM) e incubadas em estufa com

5% de CO₂ a 37 °C durante 48 horas. Como controle negativo foram utilizados macrófagos sem tratamento.

4.4 Análise da morfologia celular após tratamento

Para visualização da morfologia celular após o tratamento com ácido kójico, os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços (10⁴ células/poço), em lamínulas redondas, conforme já descrito anteriormente. Para análise das células vivas, após 48 h de tratamento, as células foram analisadas e as imagens obtidas em microscópio invertido Leica DMI6000B com câmera acoplada. Após observação das células vivas, os macrófagos foram fixados com paraformaldeído 4% e corados com Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 7,2, durante 30 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com água destilada, incubadas a 37 °C em estufa para secagem, e montadas em lâminas de vidro usando Entellan®. A morfologia dos macrófagos foi analisada e a captura das imagens feita em microscópio óptico Axio Scope A1-Zeiss com câmera digital Zeiss acoplada.

4.5 Extração de proteínas, digestão proteica e lc-ms/ms

Após o tratamento descrito acima, os macrófagos foram lisados utilizando um raspador de células, ressuspendidos em tampão de lise (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 0,5 mM; MgCl₂ 1 mM e DTT 5 mM), sonicados (3 ciclos, 10 segundos), e centrifugados a 20.000 g, por 30 minutos a 4°C após tratamento seguindo o protocolo de Li et al., (2017), e o sobrenadante será coletado após nova centrifugação. As proteínas serão quantificadas pelo método de Qubit 4 ThermoFisher™ conforme descrito pelo fabricante. Para a digestão proteica foram adicionada ureia 8 M à amostra (1:1); a redução foi feita com DTT 5 mM por 25 minutos a 56°C; a alquilação foi com iodoacetamida 14 mM por 30 minutos protegido da luz. A amostra será diluída na proporção de 1:5 em solução de bicarbonato de amônio 50 mM, será adicionado CaCl₂ 1 mM e a solução de tripsina (20 ng/μl), deixando a digestão *overnight* (16 horas, 37°C).

O LC-MS/MS será realizada no Laboratório de Proteômica (LProt) - ICB/UFPA, a amostra foi dessalinizada utilizando uma coluna C18. A coluna foi ativada com 3 mL de acetonitrila 100%, equilibrada com 1 mL de acetonitrila 50% com 0,1% de ácido fórmico, e equilibrada novamente com 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. A

amostra foi previamente acidificada com TFA 0,4%, sendo carregada na C18, e o sal retirado da amostra com 3 mL de TFA 0,1%, posteriormente foi equilibrada novamente a coluna com 1 mL de ácido fórmico, e a amostra foi eluída com 2mL de acetonitrila 50% com 0,1% de ácido fórmico, e 1 mL de acetonitrila 80% com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram concentradas em evaporador *SpeedVac* a 25°C e ressuspensas em formiato de amônio 20 mM, diluído 10 vezes, na proporção de 75 µL para cada 50 ng de proteína nas amostras.

4.6 Identificação das proteínas e análise dos dados

Os espectros de massa foram extraídos *em tandem* utilizando *ProteinLynx Global Server* versão 3.0.2, as amostras MS/MS foram analisadas usando *IdentityE*, com busca em banco de dados local. Na identificação de proteínas foi utilizado o *Scaffold* 4.6.1 para validação, sendo aceitos os peptídeos com mais de 90,0% de probabilidade segundo algoritmo *Peptide Prophet* (KELLER *et al.*, 2002), e as proteínas com mais de 95,0% de probabilidade contendo pelo menos um peptídeo identificado.

4.6.1 MassLynx

O MassLynx é uma ferramenta valiosa na pesquisa proteômica, pois permite a análise de conjuntos de dados proteômicos em larga escala de maneira rápida e precisa. Uma das principais aplicações do MassLynx na pesquisa proteômica é a identificação e caracterização de proteínas. O software pode analisar dados de experimentos de LC-MS e MALDI-MS, permitindo que os pesquisadores analisem uma ampla variedade de amostras. O MassLynx possui algoritmos incorporados que podem ser usados para detectar e quantificar peptídeos em misturas complexas, tornando-se uma ferramenta essencial na pesquisa proteômica.

Além disso, pode ser usado para realizar análises de modificação pós-traducional (PTM). As PTMs são modificações químicas que ocorrem em proteínas após sua síntese e podem afetar a função da proteína. Pode ser usado para identificar e quantificar PTMs específicas, como fosforilação e glicosilação, permitindo que os pesquisadores estudem o papel das PTMs em processos biológicos.

Uma das vantagens de usar o MassLynx na pesquisa proteômica é sua capacidade de lidar com grandes conjuntos de dados. O software pode processar dados de centenas ou até milhares de amostras, tornando-se uma ferramenta

essencial para estudos em larga escala. Além disso, pode ser usado em conjunto com outras aplicações de software, como Scaffold e Proteome Discoverer, permitindo que os pesquisadores realizem análises mais aprofundadas de seus dados.

Suporta uma variedade de modos de aquisição de dados comumente usados na pesquisa proteômica, incluindo DIA e DDA. DIA e DDA são amplamente utilizados para adquirir dados de misturas complexas de peptídeos. No DIA, o espectrômetro de massa é configurado para adquirir dados em uma ampla faixa de massa, resultando na aquisição de dados para todos os peptídeos presentes na amostra. No DDA, o espectrômetro de massa seleciona um número limitado de peptídeos para análise de fragmentação com base em sua abundância, resultando em um conjunto de dados mais focado.

O software suporta várias abordagens de quantificação, como iTRAQ, TMT e SILAC, que podem ser usadas para comparar a expressão de proteínas em diferentes amostras. A capacidade do MassLynx de lidar com grandes conjuntos de dados proteômicos é particularmente importante para a análise de proteômica quantitativa, pois esses experimentos geram grandes quantidades de dados.

Usado para realizar análises de proteômica estrutural, como a determinação da estrutura tridimensional de proteínas por espectrometria de massa. Essas análises podem ser realizadas usando técnicas como espectrometria de massa de ligação cruzada e espectrometria de massa de interação proteína-ligante. O MassLynx pode ser usado para analisar os dados gerados por essas técnicas e produzir modelos tridimensionais de proteínas e seus complexos.

4.6.2 PLGS

O PLGS (Protein Lynx Global Server) é um aplicativo desenvolvido pela Waters Corporation que é amplamente utilizado na análise de proteômica. O software é projetado para ser usado com dados gerados por espectrômetros de massa da Waters, como o SYNAPT e o Xevo. O PLGS oferece uma plataforma completa para a identificação, quantificação e análise de proteínas a partir de dados de espectrometria de massa.

Uma das principais funções do PLGS é a identificação de proteínas. O software utiliza algoritmos avançados para comparar espectros de massa de proteínas desconhecidas com bancos de dados de proteínas conhecidas, permitindo que os pesquisadores identifiquem rapidamente as proteínas em suas amostras. O PLGS

suporta vários métodos de busca de banco de dados, incluindo Mascot e SEQUEST, e permite que os usuários personalizem seus parâmetros de pesquisa para otimizar a precisão da identificação.

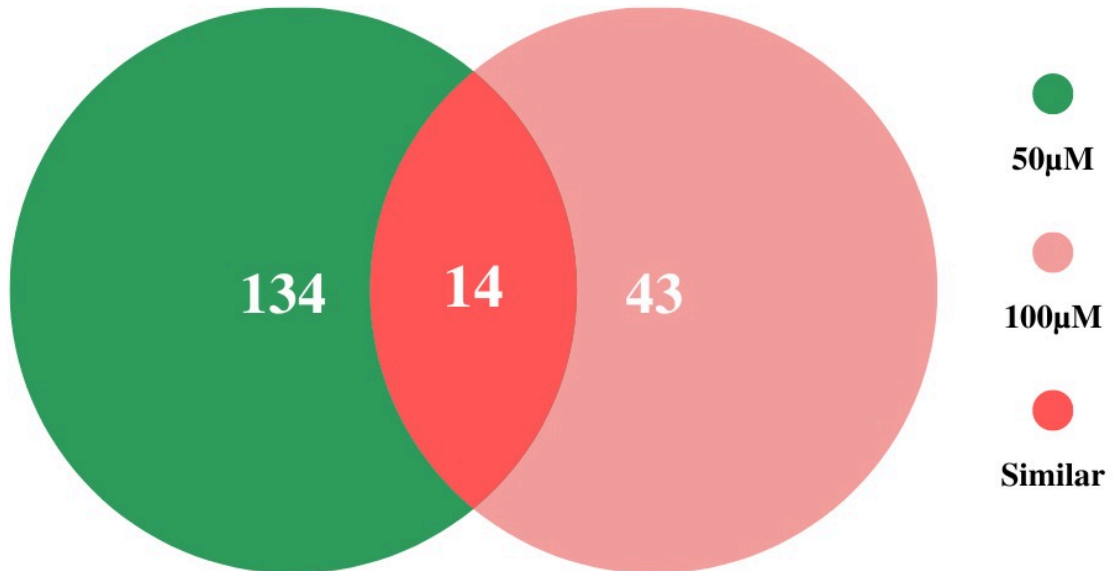
Além da identificação de proteínas, o PLGS também suporta análises quantitativas de proteômica. O software permite que os usuários comparem a abundância relativa de proteínas em diferentes amostras, usando métodos como iTRAQ e TMT. O PLGS pode lidar com grandes conjuntos de dados proteômicos, permitindo que os pesquisadores realizem análises em larga escala com facilidade.

O PLGS também é altamente personalizável, permitindo que os usuários adaptem o software para suas necessidades específicas de pesquisa. Os usuários podem personalizar seus parâmetros de pesquisa para otimizar a precisão da identificação de proteínas e ajustar os parâmetros de quantificação para atender às necessidades de certas amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil proteômico foi obtido dos macrófagos submetidos à diferentes condições de cultivo com Ácido Kójico (50 e 100 μM). Observaram-se 191 proteínas distintas que tiveram expressão nos macrófagos tratados com Ácido Kójico. Dentre essas, 134 proteínas foram encontradas exclusivamente no grupo tratado com 50 μM , 43 proteínas foram exclusivas do grupo de 100 μM e 14 proteínas expressas em ambos os grupos (Figura 2).

Figura 2: Análise quantitativa do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kójico. Diagrama de Venn relacionando o número de proteínas identificadas nas análises proteômicas.



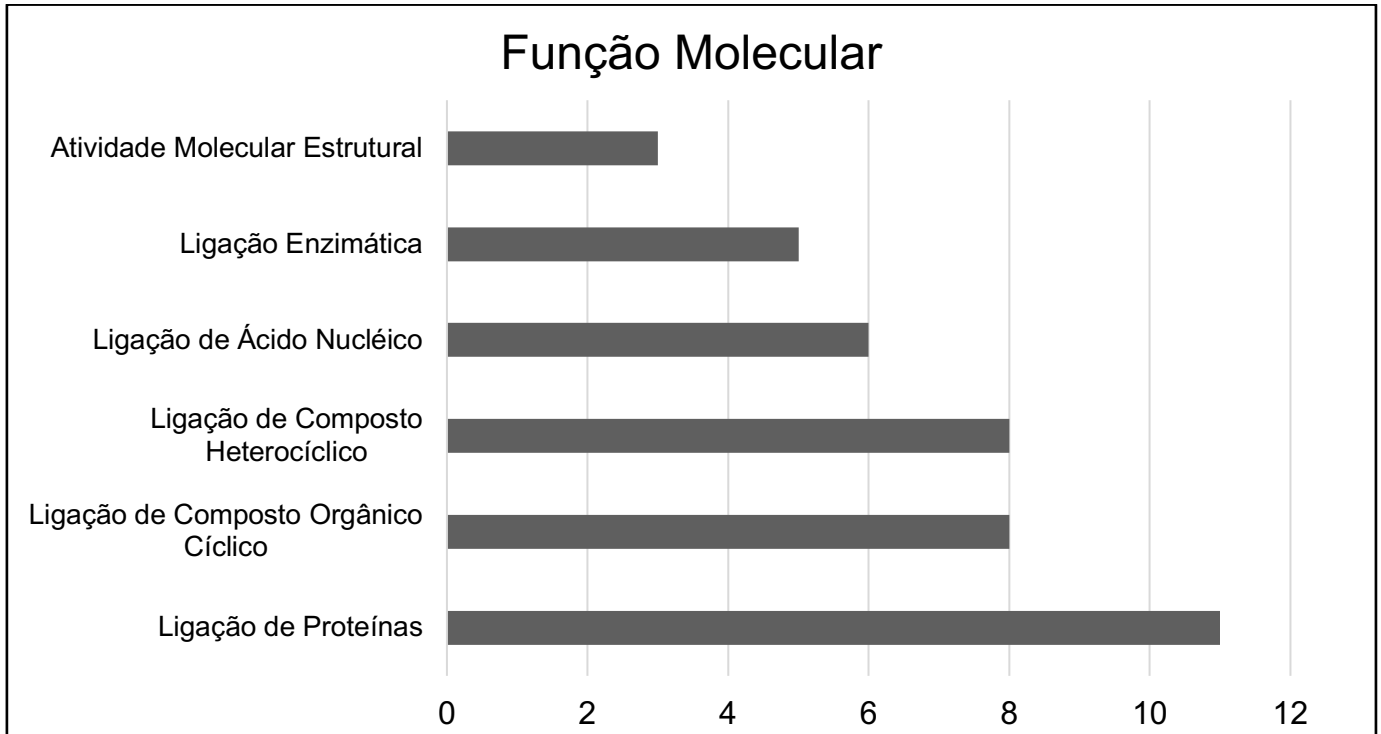
De acordo com a classificação das funções biológicas, nossos resultados revelaram que em ambas as concentrações de ácido Kójico, as 14 proteínas expressas possuem função predita relacionadas a processos do ciclo celular e oxirredução (Tabela 1). Dentre estas, destaca-se a Beta-integrina (P11835), Proteína Daple (Q6VGS5), e a Superóxido Dismutase (A0A3B2WBF0), as quais possuem grande importância para os sistemas biológicos.

Tabela 1: Proteínas expressas em macrófagos tratados com Ácido Kójico (50 e 100 μ M).

Código de Acesso Uniprot	Proteínas	Processo Biológico	Função Molecular
A0A3B2WBF0	Superoxide Dismutase	Redução de Radicais Livres	Oxiredutase
P11835	Integrin beta-2	Adesão Celular e Fagocitose	Receptor para família ICAM
P70398	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	Ciclo Celular e Divisão Celular	Hidrolase e Protease
P35550	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	Processamento do rRNA	Metiltransferase, ligação de RNA e Transferase
Q62448	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	Biossíntese de Proteínas	Fator de Iniciação e Repressor
Q6VGS5	Protein Daple	Via de Sinalização Wnt	Fator de Liberação de Guanina
Q9D8E6	60S ribosomal protein L4	Tradução citoplasmática	Proteína Ribossômica
Q8R180	ERO1-like protein alpha	Apoptose	Oxiredutase
Q64337	Sequestosome-1	Autofagia Seletiva	Ligação da Proteína Ligase da Ubiquitina
Q8VEK3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Splicing de mRNA e Divisão Celular	Regulação de Cromatina
P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Oxiredutase	Ciclo do ácido tricarboxílico
E9Q852	Afadin	Adesão Celular	-
P26638	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	Biossíntese de Proteínas	Aminoacil-tRNA Sintase
O08807	Peroxiredoxin-4	Homeostase Redox Celular e Espermatogênese	Oxiredutase

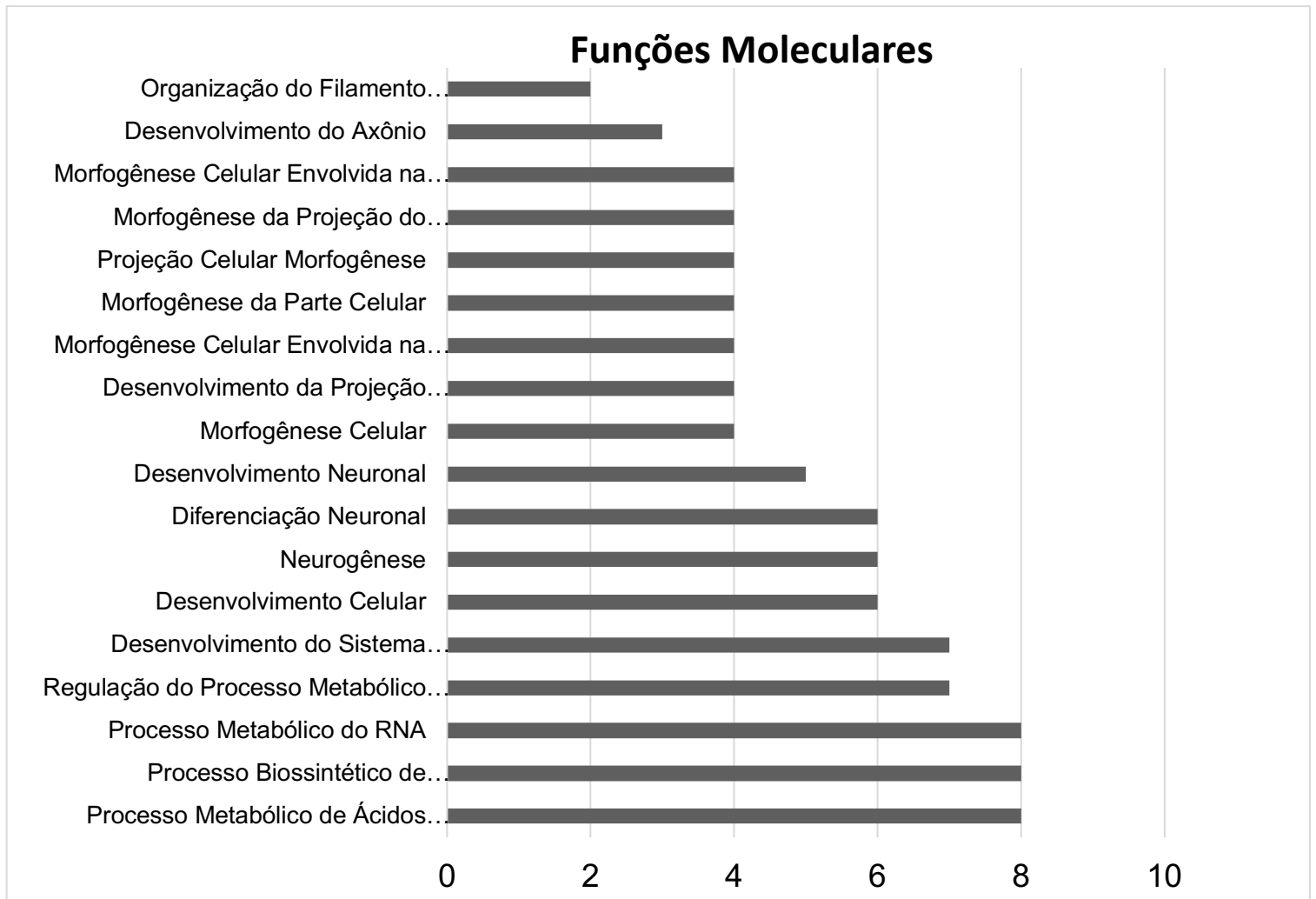
As 191 proteínas obtidas a partir do perfil proteico dos macrófagos tratados com ácido Kójico (50 e 100 μM) foram analisadas quanto a função molecular (Figura 3), observou-se que a função proteica predominante é a de interação proteína-proteína.

Figura 3: Análise das funções moleculares do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kójico.



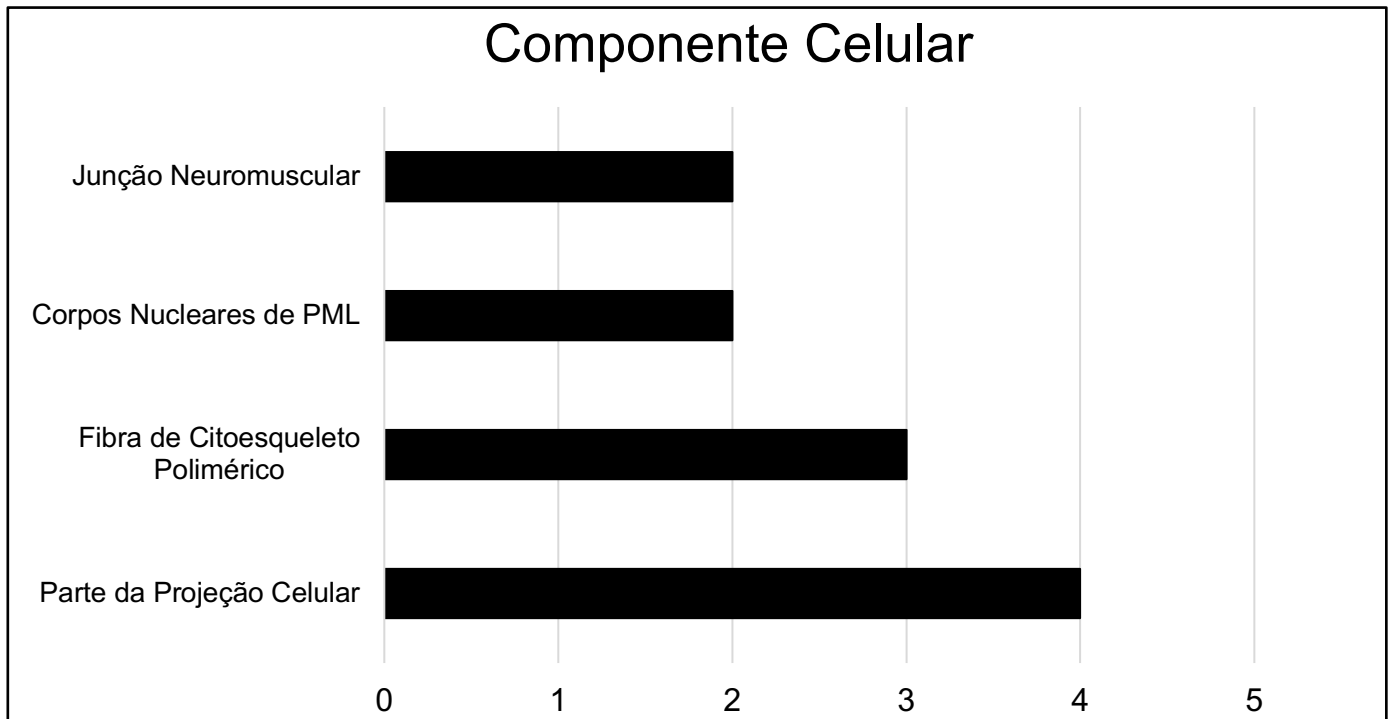
A análise das funções celulares das 191 proteínas apresentou um maior número de proteínas expressas relacionadas aos processos biossintético de macromoléculas e metabólico de ácidos nucleicos (Figura 4).

Figura 4: Análise das funções celulares do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kójico.



A análise sobre o perfil proteico e os componentes celulares relacionados demonstrou que o número maior de proteínas expressas está relacionado a parte da projeção celular (Figura 5).

Figura 5: Análise das proteínas envolvidas nos componentes celulares do perfil proteico de macrófagos tratados com 50 e 100 μM de Ácido Kójico.



Neste trabalho observamos as alterações na quantidade de proteínas encontradas nas culturas de macrófagos, expressas nas duas concentrações de Ácido Kójico (50 e 100 μM) utilizadas, de tal forma que essas alterações independem da concentração a qual o macrófago foi exposto.

O ácido kójico, um composto natural derivado do fungo *Aspergillus oryzae*, tem sido amplamente estudado devido às suas propriedades bacteriostáticas. Essa substância tem a capacidade de inibir o crescimento e a proliferação de várias espécies bacterianas, tornando-a potencial ferramenta na luta contra infecções bacterianas. Em macrófagos, células do sistema imunológico com um papel central na resposta imune, o ácido kójico tem demonstrado efeitos bacteriostáticos significativos. Quando os macrófagos são expostos ao ácido kójico, ocorrem alterações na resposta imune dessas células em relação às bactérias invasoras.

Estudos têm demonstrado que o ácido kójico promove a ativação dos macrófagos, aumentando sua capacidade fagocítica, que é a habilidade de englobar e destruir as bactérias. Além disso, o ácido kójico tem mostrado a capacidade de modular a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas, pelos macrófagos. Ele tem sido relatado como um inibidor do fator nuclear kappa B (NF- κ B), uma proteína chave envolvida na regulação da expressão de genes inflamatórios. A

inibição do NF- κ B pelo ácido kójico resulta na redução da expressão de genes pró-inflamatórios, contribuindo para a atenuação da resposta inflamatória.

Outro mecanismo importante do ácido kójico é a modulação da atividade da enzima ciclo-oxigenase (COX). A COX é responsável pela síntese de prostaglandinas, mediadores inflamatórios envolvidos na dor e na inflamação. O ácido kójico tem demonstrado a capacidade de inibir a atividade da COX, reduzindo assim a síntese de prostaglandinas e a resposta inflamatória.

Estudos recentes demonstraram que o tratamento com ácido kójico pode aumentar a expressão de SOD em macrófagos. A regulação positiva da SOD pelo ácido kójico é de grande relevância, pois a SOD desempenha um papel fundamental na neutralização de radicais livres, como o superóxido, que são altamente reativos e podem causar danos às células. O estresse oxidativo está associado a uma série de condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias. A capacidade do ácido kójico em aumentar a expressão de SOD em macrófagos sugere que ele pode ter um potencial terapêutico significativo no combate ao estresse oxidativo e às doenças relacionadas.

Além disso, macrófagos desempenham um papel crucial no sistema imunológico, pois são responsáveis pela fagocitose de patógenos e pela liberação de mediadores inflamatórios. A regulação positiva da expressão de SOD pelo ácido kójico em macrófagos pode ter implicações importantes na modulação da resposta inflamatória. A SOD contribui para a redução do estresse oxidativo e do dano oxidativo associado à inflamação, auxiliando na manutenção da homeostase celular e na resolução da resposta inflamatória.

A Integrina beta-2 é uma proteína de adesão celular que desempenha um papel crucial na função dos macrófagos, incluindo migração, adesão e fagocitose. A regulação adequada da expressão de Integrina beta-2 é essencial para o bom funcionamento dessas células do sistema imunológico. Estudos recentes demonstraram que o tratamento com ácido kójico pode resultar no aumento da expressão de Integrina beta-2 em macrófagos. Essa descoberta sugere que o ácido kójico possui propriedades bioativas capazes de regular positivamente a expressão dessa proteína. A modulação da expressão pode ter implicações significativas na função dos macrófagos, influenciando sua capacidade de adesão a superfícies celulares, migração em direção a locais de infecção e resposta imune efetiva.

Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X (FAF-X) é uma enzima pertencente à família das hidrolases de ubiquitina, que desempenham um papel importante na regulação da degradação de proteínas marcadas com ubiquitina. A expressão adequada de FAF-X é essencial para manter a homeostase proteica nas células. Recentemente, pesquisas têm investigado o efeito do ácido kójico na regulação da expressão de FAF-X em macrófagos, revelando sua possível importância na modulação da degradação proteica e nas respostas celulares, regulação de FAF-X pelo ácido kójico pode ter implicações significativas em processos celulares, incluindo sinalização celular, metabolismo de proteínas e resposta imunológica.

A fibrilarina é uma enzima importante envolvida na metilação de rRNA (ribossomal RNA), que desempenha um papel crucial na síntese de proteínas e no funcionamento adequado dos ribossomos. A regulação adequada da expressão de rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarín é essencial para a estabilidade e funcionalidade dos ribossomos nas células. Pesquisas recentes têm explorado o efeito do ácido kójico na expressão de fibrilarina em macrófagos, revelando possíveis implicações na síntese proteica e na resposta imunológica. A modulação da expressão de fibrilarina pode ter implicações importantes na função dos ribossomos e no metabolismo proteico nas células.

Os ribossomos desempenham um papel essencial na síntese de proteínas, e a metilação do rRNA pela fibrillarín é fundamental para a estabilidade e funcionalidade dos ribossomos. A regulação positiva da expressão de fibrillarín pelo ácido kójico pode levar a um aumento da metilação do rRNA, o que pode influenciar a síntese de proteínas nas células. Isso pode ter efeitos significativos na função celular, incluindo o metabolismo proteico, a resposta imunológica e a proliferação celular.

O Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF4G2) é uma proteína envolvida na iniciação da tradução de proteínas, desempenhando um papel essencial na síntese proteica nas células. A regulação adequada da expressão de eIF4G2 é crucial para o controle da tradução de proteínas e para o funcionamento adequado do sistema de síntese proteica. Pesquisas recentes têm investigado o efeito do ácido kójico na expressão de eIF4G2 em macrófagos, revelando possíveis implicações na síntese de proteínas e na resposta imunológica.

A tradução de proteínas desempenha um papel central na função celular e na resposta imunológica. A regulação positiva da expressão de eIF4G2 pelo ácido kójico

pode aumentar a disponibilidade dessa proteína essencial na maquinaria de tradução de proteínas. Isso pode resultar em uma maior eficiência na síntese de proteínas e influenciar a função e o metabolismo celulares.

O ácido fólico tem sido objeto de estudos devido à sua capacidade de modular a expressão de diversas proteínas em macrófagos. Dentre essas proteínas estão Protein Daple, 60S ribosomal protein L4, ERO1-like protein alpha, Sequestosome-1, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, Malate dehydrogenase, mitochondrial, Afadin, Serine--tRNA ligase cytoplasmic, e Peroxiredoxin-4. A regulação dessas proteínas pelo ácido fólico pode ter implicações significativas nas funções celulares e nas respostas imunológicas.

Protein Daple é uma proteína envolvida na sinalização celular e na modulação do desenvolvimento e crescimento celular. Estudos recentes sugerem que o ácido fólico pode influenciar positivamente a expressão de Protein Daple em macrófagos. Essa regulação pode ter implicações na resposta imunológica e na capacidade dos macrófagos de se comunicarem com outras células através de vias de sinalização específicas.

A 60S ribosomal protein L4 é uma proteína ribossomal envolvida na síntese de proteínas e no funcionamento adequado dos ribossomos. O ácido fólico tem demonstrado potencial em modular a expressão dessa proteína em macrófagos. Isso pode afetar a eficiência da síntese proteica e o metabolismo celular, impactando assim a função dos macrófagos na resposta imunológica e na homeostase celular.

ERO1-like protein alpha está envolvida na resposta ao estresse oxidativo e no controle do estado redox celular. Estudos sugerem que o ácido fólico pode modular a expressão dessa proteína em macrófagos, o que pode ter implicações na regulação do estresse oxidativo e na resposta adaptativa das células a condições adversas.

Sequestosome-1, também conhecida como p62, é uma proteína que desempenha um papel importante na degradação seletiva de proteínas danificadas e no controle da resposta inflamatória. O ácido fólico tem sido investigado por sua capacidade de modular a expressão de Sequestosome-1 em macrófagos. Essa regulação pode afetar a resposta inflamatória e a eliminação de proteínas danificadas, contribuindo para a homeostase celular e a resolução da inflamação.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) é uma proteína envolvida no processamento do RNA e na regulação da expressão gênica. O ácido fólico tem sido estudado por sua capacidade de modular a expressão de hnRNP U

em macrófagos. Essa regulação pode influenciar a expressão de genes envolvidos em processos celulares importantes, como a resposta imunológica e a proliferação celular.

Malate dehydrogenase, mitochondrial (MDH) é uma enzima envolvida no metabolismo energético das células. Estudos têm demonstrado que o ácido fólico pode modular a expressão de MDH em macrófagos, o que pode afetar o metabolismo energético e a função celular.

Afadin é uma proteína envolvida na adesão celular e na comunicação entre células. A regulação da expressão de Afadin pelo ácido fólico em macrófagos pode afetar a adesão celular e a interação entre macrófagos e outras células, influenciando assim a resposta imunológica e a função celular.

Serine--tRNA ligase cytoplasmic é uma enzima envolvida na síntese de tRNA (ácido ribonucleico de transferência) e na tradução de proteínas. O ácido fólico tem sido investigado por sua capacidade de modular a expressão dessa enzima em macrófagos. Isso pode afetar a síntese proteica e a resposta imunológica, contribuindo para a função adequada dos macrófagos.

Peroxiredoxin-4 é uma enzima antioxidante que protege as células do estresse oxidativo. O ácido fólico tem demonstrado potencial em modular a expressão de Peroxiredoxin-4 em macrófagos. Essa regulação pode influenciar a capacidade dos macrófagos de combater o estresse oxidativo e manter a homeostase celular.

Em resumo, o ácido fólico tem demonstrado a capacidade de modular a expressão de diversas proteínas em macrófagos, incluindo Protein Daple, 60S ribosomal protein L4, ERO1-like protein alpha, Sequestosome-1, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, Malate dehydrogenase, mitochondrial, Afadin, Serine--tRNA ligase cytoplasmic, e Peroxiredoxin-4. Essa regulação pode afetar a função celular, a resposta imunológica e o metabolismo proteico. No entanto, mais pesquisas são necessárias para compreender completamente os mecanismos envolvidos e explorar o potencial terapêutico do ácido fólico na modulação dessas proteínas em diferentes contextos fisiológicos e patológicos.

Primeiramente, o ácido fólico mostrou-se capaz de aumentar a expressão de Superóxido dismutase (SOD) em macrófagos. A regulação positiva de SOD pelo ácido fólico pode ter um impacto significativo na redução do estresse oxidativo e no aumento da capacidade antioxidante das células, auxiliando na proteção contra danos oxidativos e na manutenção da homeostase celular.

Além disso, demonstrou a capacidade de modular a expressão de Integrin beta-2 em macrófagos. Isso pode afetar a capacidade dos macrófagos de aderir a superfícies celulares, migrar para locais de infecção e desempenhar suas funções imunológicas de maneira eficaz.

Outra proteína que pode ser regulada pelo ácido kójico é a Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X. A modulação da expressão de FAF-X pelo ácido kojico pode afetar a degradação de proteínas marcadas com ubiquitina, influenciando assim a regulação proteica nas células e a resposta imunológica.

Estudos também indicam que o ácido kójico pode influenciar a expressão de rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar in macrófagos. Isso pode ter implicações importantes na síntese de proteínas, no metabolismo celular e nas respostas ao estresse e imunológicas.

Além dessas proteínas específicas, o ácido kójico também demonstrou a capacidade de modular a expressão de outras proteínas em macrófagos, como Protein Daple, 60S ribosomal protein L4, ERO1-like protein alpha, Sequestosome-1, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, Malate dehydrogenase, mitochondrial, Afadin, Serine--tRNA ligase cytoplasmic e Peroxiredoxin-4. Essa regulação pode ter impactos em diferentes aspectos das funções celulares, da resposta imunológica e do metabolismo proteico.

Portanto, o ácido kójico apresenta um potencial promissor na regulação de proteínas em macrófagos, abrindo caminho para várias aplicações biotecnológicas. A capacidade do ácido kójico em modular a expressão de proteínas específicas em macrófagos pode ter implicações importantes no combate ao estresse oxidativo, na modulação da resposta imunológica, na regulação proteica e no metabolismo celular. No entanto, é necessário um aprofundamento dos estudos para compreender completamente os mecanismos envolvidos nessa regulação e para avaliar o potencial terapêutico em diferentes doenças e condições relacionadas à função dos macrófagos.

6. CONCLUSÃO

A presente dissertação investigou o efeito do ácido kójico na expressão proteica de macrófagos, buscando compreender suas implicações na modulação do sistema imune. Os resultados revelaram que o tratamento com o ácido kójico levou à expressão diferencial de proteínas envolvidas em processos biológicos fundamentais,

como metabolismo, ciclo celular e a regulação do estresse oxidativo. A presença de proteínas relacionadas à adesão celular e à resposta inflamatória sugere que o ácido kójico pode influenciar diretamente a função dos macrófagos, contribuindo para uma resposta imune mais eficiente. Esses achados corroboram com estudos anteriores sobre a capacidade imunomoduladora do ácido kójico a partir de técnicas de proteômicas e ampliam o conhecimento sobre seu impacto em células do sistema inato.

A análise proteômica permitiu identificar que proteínas-chave, como a Superóxido Dismutase (SOD) e a Integrina Beta-2, foram reguladas pelo ácido kójico, indicando possíveis benefícios no controle do estresse oxidativo e na resposta inflamatória. A modulação da expressão de proteínas relacionadas à degradação proteica e ao metabolismo celular também sugere que o ácido kójico pode desempenhar um papel relevante na homeostase celular dos macrófagos. Ademais, as diferenças observadas de tratamento indicam que a dose do ácido kójico pode influenciar a ação sobre essas células, destacando a importância de estudos futuros para avaliar sua segurança e eficácia em modelos mais complexos.

Dessa forma, este estudo contribui para a compreensão dos efeitos do ácido kójico no sistema imunológico e abre novas perspectivas para sua aplicação em biotecnologia e terapias imunomoduladoras. Estudos futuros poderão avaliar os efeitos do ácido kójico em outras células do sistema imune e em modelos *in vivo*, consolidando seu potencial como um modulador biológico com aplicações terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ANES, E.; PEYRON, P.; STAALI, L.; JORDAO, L.; GUTIERREZ, M. G.; KRESS, H.; HAGEDORN, M.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; SKINNER, M. A.; WILDEMAN, A. G.; KALAMIDAS, S. A.; KUEHNEL, M.; GRIFFITHS, G. Dynamic life and death interactions between *Mycobacterium smegmatis* and J774 macrophages. **Cell Microbiol**, 8, n. 6, p. 939-960, Jun 2006.
- CHERDCHOM, S.; SEREEMASPUN, A.; ARAMWIT, P. Urea-extracted sericin is potentially better than kojic acid in the inhibition of melanogenesis through increased reactive oxygen species generation. **J Tradit Complement Med**, 11, n. 6, p. 570-580, Nov 2021.
- DA COSTA, J. P.; RODRIGUES, A. P. D.; FARIAS, L. H. S.; FRADE, P. C. R.; DA SILVA, B. J. M.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E. O. Biological effects of kojic acid on human monocytes in vitro. **Biomed Pharmacother**, 101, p. 100-106, May 2018.
- EL-SHARKAWY, S. H. Kojic acid production from cocoa juice by *Aspergillus flavus* entrapped in calcium alginate. **Boll Chim Farm**, 134, n. 6, p. 316-319, Jun 1995.
- KELLER, A.; NESVIZHSKII, A. I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Anal Chem**, 74, n. 20, p. 5383-5392, Oct 15 2002.
- KHAN, A.; PARK, T. J.; IKRAM, M.; AHMAD, S.; AHMAD, R.; JO, M. G.; KIM, M. O. Antioxidative and Anti-inflammatory Effects of Kojic Acid in A β -Induced Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Mol Neurobiol**, 58, n. 10, p. 5127-5140, Oct 2021.
- KOLLINIATI, O.; IERONYMAKI, E.; VERGADI, E.; TSATSANIS, C. Metabolic Regulation of Macrophage Activation. **J Innate Immun**, 14, n. 1, p. 51-68, 2022.

KWAK, M. Y.; RHEE, J. S. Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. **Biotechnol Bioeng**, 39, n. 9, p. 903-906, Apr 15 1992.

LI, P.; WANG, R.; DONG, W.; HU, L.; ZONG, B.; ZHANG, Y.; WANG, X.; GUO, A.; ZHANG, A.; XIANG, Y.; CHEN, H.; TAN, C. Comparative Proteomics Analysis of Human Macrophages Infected with Virulent *Mycobacterium bovis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7, 2017-March-09 2017. Original Research.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F.; KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, 60, n. 11, p. 2334-2346, 2003/11/01 2003.

RODRIGUES, A. P.; FARIAS, L. H.; CARVALHO, A. S.; SANTOS, A. S.; DO NASCIMENTO, J. L.; SILVA, E. O. A novel function for kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* fungi, as antileishmanial agent. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e91259, 2014.

SAEEDI, M.; ESLAMIFAR, M.; KHEZRI, K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 110, p. 582-593, 2019/02/01/ 2019.

SCHULTZE, J. L.; SCHMIDT, S. V. Molecular features of macrophage activation. **Seminars in Immunology**, 27, n. 6, p. 416-423, 2015/12/01/ 2015.

UCHINO, K.; NAGAWA, M.; TONOSAKI, Y.; ODA, M.; FUKUCHI, A. Kojic Acid as an Anti-speck Agent. **Agricultural and Biological Chemistry**, 52, n. 10, p. 2609-2610, 1988/10/01 1988.

VERSCHOOR, C. P.; PUCHTA, A.; BOWDISH, D. M. E. The Macrophage. *In*: ASHMAN, R. B. (Ed.). **Leucocytes: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 139-156.

ZACHARY, C. M.; WANG, J. V.; SAEDI, N. Kojic Acid for Melasma: Popular Ingredient in Skincare Products. **Skinmed**, 18, n. 5, p. 271-273, 2020.

ZILLES, J. C.; DOS SANTOS, F. L.; KULKAMP-GUERREIRO, I. C.; CONTRI, R. V. Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives: A review. **Experimental Dermatology**, 31, n. 10, p. 1500-1521, 2022/10/01 2022.
<https://doi.org/10.1111/exd.14662>.