

VANESSA DA SILVA ESCHIMITH

**AVALIAÇÃO DA EPIISOPILOSINA, UM ALCALOIDE DE
Pilocarpus microphyllus NA FUNÇÃO DE MICRÓGLIAS IMORTALIZADAS**

Brasília, Distrito Federal

2023

VANESSA DA SILVA ESCHIMITH

**AVALIAÇÃO DA EPIISOPILOSINA, UM ALCALOIDE DE
Pilocarpus microphyllus NA FUNÇÃO DE MICRÓGLIAS IMORTALIZADAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Dr^a. Selma Aparecida Souza Kuckelhaus

Co-orientadora: Dr^a Tatiana Karla dos Santos Borges



Brasília, Distrito Federal

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da da Silva Eschimith, Vanessa
AVALIAÇÃO DA EPIISOPILOSINA, UM ALCALÓIDE DE *Pilocarpus
microphyllus* NA FUNÇÃO DE MICRÓGLIAS IMORTALIZADAS /
Vanessa da Silva Eschimith; orientador Selma Aparecida Souza
Kuckelhaus; co-orientador Tatiana Karla dos Santos Borges.
-- Brasília, 2023.
86 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2023.

1. Moléculas bioativas. 2. Alcaloides. 3. Epiisopilosina.
4. Micróglia. 5. Atividade inflamatória. I. Aparecida Souza
Kuckelhaus, Selma, orient. II. Karla dos Santos Borges,
Tatiana, co-orient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Vanessa da Silva Eschimith

**AVALIAÇÃO DA EPIISOPILOSINA, UM ALCALOIDE DE
Pilocarpus microphyllus NA FUNÇÃO DE MICRÓGLIAS IMORTALIZADAS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Selma Aparecida de Souza Kückelhaus

Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicadas,
Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges

Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicadas,
Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Prof^a Dra. Heliara maria Spina Canela

Universidade do Rio Verde (FESURV), Rio Verde, Goiás

Prof. Dra. Thais Tâmara Castro e Souza Minuzzi

Ministério da Saúde, Brasil

Prof. Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro (suplente)

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Brasília, 30 de outubro de 2023

DEDICATÓRIA

Ao senhor dos ferros, que irradia coragem e esperança nos dias difíceis e abre os caminhos para que seus protegidos possam passar.

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicadas (Nupmia) da Universidade de Brasília – DF, pelo programa de Pós Graduação Medicina Tropical, com o apoio parcial dos recursos cedidos pelo Programa de Apoio a Pós Graduação (PROAP), processo de número: 23106.066111/2022-10 e pela bolsa de estudos oferecida pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por seu imenso amor ao plantar em meu coração sonhos que sem sua infinita bondade não se tornariam realidade e São Jorge por sua proteção e por me irradiar coragem e força nos dias mais difíceis.

Agradeço a minha orientadora Selma Kückelhaus por aceitar esse desafio desde o primeiro contato e sua orientação durante esse período e a minha co-orientadora Tatiana Borges, responsável por minha iniciação no mundo científico e pelas madrugadas de experimento em que me auxiliou.

Agradeço as técnicas Shirley Claudino, Mariângela Souza e Viviane Medeiros, pelo conhecimento compartilhado, palavras positivas e auxílio em todas as milhões de dúvidas que tive e pude aprender com a experiência que todas possuem.

Ao meu amigo e professor Breno Abreu, que em horas de conversas me apoiou e acreditou na minha capacidade de realização no mestrado.

Minha mãe Sheila Vieira, a pessoa que mais amo nesse mundo, por todo acalento e proteção quando necessário. Ao Natan Gabriel por toda força, companhia, carinho e palavras de conforto, além de me lembrar todos os dias da pessoa que fui, sou e possivelmente serei.

Às minhas amigas Carol Ciarlini e Ariane Nogueira pelos momentos de conversas, risadas, troca de aprendizado e suporte que nos proporcionamos em processos experimentais pessoais e espirituais. As levarei sempre comigo.

E por fim, agradeço a toda minha família, amigos e colegas que contribuíram diretamente ou indiretamente para que esse trabalho pudesse ser realizado.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Fotografia da espécie <i>Pilocarpus microphyllus</i> .	6
Figura 2	Fluxograma dos ensaios.	16
Figura 3	Fotomicrografias dos cultivos celulares	17
Figura 4	Estrutura química da epiisopilosina	18
Figura 5	Percentual de células C20 viáveis incubadas por 24 horas	26
Figura 6	Percentual de células BV-2 viáveis incubadas por 2 ou 24 horas	27
Figura 7	Percentual de células C20 aderidas	28
Figura 8	Produção de EROS por células C20	29
Figura 9	Produção de ERNS por células C20	31
Figura 10	Produção de ERNS pelas células C20 (agrupada)	31
Figura 11	Produção de corpúsculos lipídicos por células C-20.	33
Figura 12	Produção de corpúsculos lipídicos por células C-20 (agrupada)	34
Figura 13	Capacidade fagocitária das células BV-2.	37
Figura 14	Fotomicrografias de células BV2 representativas dos resultados da capacidade fagocitária.	38
Figura 15	Percentual de células BV2 que produziram o radical superóxido (O_2°)	39
Tabela 1	Produção de citocinas pelas células C20	35
Tabela 2	Capacidade fagocitária das células BV-2	36
Tabela 3	Sumário dos resultados	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA	Albumina de soro bovino
BV2	Células BV2
C20	Células C20
CL	Corpúsculo lipídico
CO ₂	Gas carbônico
COX	Ciclooxigenase
DA	Doença de Alzheimer
DAF-FM	<i>Diacetate (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate)</i>
DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM- F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DP	doença de parkinson
DTNs	Doenças Tropicais negligenciadas
EPI	Episopiloturina
EPIIS	Epiisopilosina
ERNS	Espécie reativa de nitrogênio
EROS	Espécie reativa de oxigênio
FMLP	<i>N-Formyl-Met-Leu-Phe</i>
HaCat	Queratinócitos humanos
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina -2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-23	Interleucina-23
INF- γ	Interferon gama
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago tipo 1

M2	Macrófago tipo 2
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade tipo I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade tipo II
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
N	Nitrogênio
NA	Não alteração
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NIH3T3	Fibroblastos murinos
NO	Óxido nítrico
NBT	<i>Nitrizuril Blue Tetrazolium</i>
NuPMIA	Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicadas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PMA	13-acetato forbol 12-miristato
R ₂ NH	Amina Secundária
R ₃ N	Amina Terciária
RNH ₂	Amina Primária
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RRPs	Receptores de reconhecimento padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
STF	Salina tamponada com fosfato
Th1	<i>The helper 1</i>
Th2	<i>The helper 2</i>
Th17	<i>The helper 17</i>
TLRs	Receptores semelhantes ao <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral

RESUMO

Introdução: A prospecção de novas moléculas é importante para contrapor ao grande número de agentes infecciosos, doenças e condições pelos mecanismos de resistência e tolerância aos medicamentos. Os alcaloides constituem um grupo amplo de moléculas cuja atividade biológica vem sendo cada vez mais explorada pela sua capacidade de interação com receptores e proteínas celulares. A epiisopilosina (EPIIS) obtida da espécie *Pilocarpus microphyllus* apresenta baixa citotoxicidade e efeito anti-inflamatório. Considerando a função dos macrófagos no sistema imunitário, esse estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações da EPIIS na função inata de macrófagos/micróglias imortalizados. **Material e Método:** Trata-se de um estudo experimental, descritivo e in vitro realizado com células da linhagem C20 (micróglias humanas) e BV2 (Micróglias murinas) para avaliar o efeito de diferentes concentrações da EPIIS na viabilidade celular (método do MTT e quimioluminescência), na aderência celular em lamínulas, e por citometria de fluxo, na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNS), na produção de corpúsculos lipídicos (CL) e de citocinas; por método morfológico, avaliou-se o índice fagocitário (IF) e a produção do radical superóxido (O_2^\bullet). **Resultados: 1)** as diferentes concentrações (0,5 a 128 $\mu\text{g/mL}$) não afetaram o metabolismo mitocondrial das células C-20 quando incubadas por 24 h (teste do MTT); **2)** a quimioluminescência mostrou que 1 ou 4 a 32 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a atividade mitocondrial/viabilidade das células C-20, mas reduziu com 128 $\mu\text{g/mL}$; **3)** a incubação das células BV-2 com 0,5 $\mu\text{g/mL}/2\text{h}$ ou com 32, 64 ou 128 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h aumentaram o % de células viáveis (teste do MTT), mas as demais concentrações não afetaram o metabolismo mitocondrial das células (2 ou 24 h); **4)** houve redução no % de células C-20 aderidas pela incubação por 24 h com 4,0 ou 64,0 $\mu\text{g/mL}$; **5)** a maior concentração (64,0 $\mu\text{g/mL}$) aumentou a produção estimulada ou basal de EROS e a produção basal de ERNS pelas células C-20; **6)** a produção estimulada de ERNS (LPS ou LPS + TNF) foi inibida pelas células C-20 com 64,0 $\mu\text{g/mL}$; **7)** a produção basal de CL foi maior nas células C-20 com 0,5 $\mu\text{g/mL}$, mas a estimulada (LPS) foi inibida com 64,0 $\mu\text{g/mL}$; **8)** a menor concentração (0,5 $\mu\text{g/mL}$) aumentou a produção basal de IL-17A das células C-20, mas foi inibida na presença do LPS com 0,5, 4,0 ou 64,0 $\mu\text{g/mL}$; **9)** as três concentrações de EPIIS não afetaram a produção basal das citocinas IL-2, IL-6, FNT, INF, IL-4 ou IL-10 nas células C-20; **10)** 4 $\mu\text{g/mL}/2\text{h}$ aumentou o IF das células BV-2 pelo maior % de células fagocitantes (%cel), enquanto que 0,5 ou 4,0 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h reduziu o IF pela menor %cels e pelo menor nº de leveduras ingeridas (Mlev). Quanto ao tempo de incubação (2 ou 24 horas) com as células BV-2 os resultados mostraram que: **11)** houve redução na produção do radical O_2^\bullet nas três concentrações com 2 h, mas não com 24 h; **12)** comparado com 2 h, houve aumento na Mlev com 64 $\mu\text{g/mL}/24\text{ h}$; **13)** o IF foi maior com 24 h no controle, do que com 2 h, pelo maior %céls e pela Mlev; **14)** A produção do radical O_2^\bullet foi maior com 64 $\mu\text{g/mL}/24\text{ h}$, comparado com 2 h. **Conclusão:** O conjunto dos ensaios funcionais demonstraram que as três concentrações de EPIIS afetaram a atividade mitocondrial das micróglias, a expressão de receptores de aderência, a produção de EROS e ERNS, a produção de corpúsculos lipídicos/citocinas e a capacidade fagocitária, evidenciando o potencial das da EPIIS em modular a resposta imunitária inata das micróglias, assim, sugere-se a continuidade dos estudos visando a futuras aplicações biomédicas in vivo.

Palavras chave: Atividade mitocondrial. EROS e ERNS. Capacidade fagocitária. Corpúsculo lipídico. Citocinas.

ABSTRACT

Introduction: The search for new molecules is important to counteract the large number of infectious agents, diseases and conditions through the mechanisms of drug resistance and tolerance. Alkaloids are a broad group of molecules whose biological activity has been increasingly explored due to their ability to interact with cell receptors and proteins. Epiisopilosin (EPIIS) obtained from the species *Pilocarpus microphyllus* has low cytotoxicity and anti-inflammatory effects. Considering the function of macrophages in the immune system, this study evaluated the effect of different concentrations of EPIIS on the innate function of immortalized macrophages/microglia. **Material and Methods:** This is an experimental, descriptive and in vitro study carried out with C20 (human microglia) and BV2 (murine microglia) cells to evaluate the effect of different concentrations of EPIIS on cell viability (MTT method and chemiluminescence), cell adherence on coverslips, and by flow cytometry, the production of reactive oxygen (EROS) and nitrogen (ERNS) species, the production of lipid corpuscles (LC) and cytokines; by morphological method, the phagocytic index (PI) and the production of the superoxide radical were assessed (O_2°). **Results:** **1)** the different concentrations (0.5 to 128 $\mu\text{g/mL}$) did not affect the mitochondrial metabolism of C-20 cells when incubated for 24 h (MTT test); **2)** chemiluminescence showed that 1 or 4 at 32 $\mu\text{g/mL}$ increased the mitochondrial activity/viability of C-20 cells, but reduced it with 128 $\mu\text{g/mL}$; **3)** incubation of BV-2 cells with 0.5 $\mu\text{g/mL}/2\text{h}$ or with 32, 64 or 128 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h increased the % of viable cells (MTT test), but the other concentrations did not affect the mitochondrial metabolism of the cells (2 or 24 h); **4)** there was a reduction in the % of adhered C-20 cells by incubation for 24 h with 4.0 or 64.0 $\mu\text{g/mL}$; **5)** the highest concentration (64.0 $\mu\text{g/mL}$) increased the stimulated or basal production of EROS and the basal production of ERNS by C-20 cells; **6)** the stimulated production of ERNS (LPS or LPS + TNF) was inhibited by C-20 cells with 64.0 $\mu\text{g/mL}$; **7)** the basal production of CL was higher in C-20 cells with 0.5 $\mu\text{g/mL}$, but the stimulated one (LPS) was inhibited with 64.0 $\mu\text{g/mL}$; **8)** the lowest concentration (0.5 $\mu\text{g/mL}$) increased the basal production of IL-17A in C-20 cells, but was inhibited in the presence of LPS at 0.5, 4.0 or 64.0 $\mu\text{g/mL}$; **9)** the three concentrations of EPIIS did not affect the basal production of the cytokines IL-2, IL-6, NTF, INF, IL-4 or IL-10 in C-20 cells; **10)** 4 $\mu\text{g/mL}/2\text{h}$ increased the IF of BV-2 cells by the highest % of phagocytizing cells (%cels), while 0.5 or 4.0 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h reduced the IF by the lowest %cels and the lowest number of yeasts ingested (Mlev). As for the incubation time (2 or 24 hours) with BV-2 cells, the results showed that: **11)** there was a reduction in the production of the O_2° radical at the three concentrations at 2 h, but not at 24 h; **12)** compared to 2 h, there was an increase in Mlev at 64 $\mu\text{g/mL}/24\text{ h}$; **13)** the IF was higher at 24 h in the control, than at 2 h, due to the higher %cels and Mlev; **14)** the production of the O_2° radical was higher at 64 $\mu\text{g/mL}/24\text{ h}$, compared to 2 h. **Conclusion:** All the functional tests showed that the three concentrations of EPIIS affected the mitochondrial activity of microglia, the expression of adhesion receptors, the production of EROS and ERNS, the production of lipid corpuscles/cytokines and phagocytic capacity, demonstrating the potential of EPIIS to modulate the innate immune response of microglia, thus suggesting the continuation of studies aimed at future biomedical applications in vivo.

Key words: Mitochondrial activity. EROS and ERNS. Phagocytic capacity. Lipid corpuscle. Cytokines.

SUMÁRIO

	RESUMO	xi
	ABSTRACT	xii
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A prospecção de moléculas bioativas	2
1.2	Alcaloides	3
1.3	Epiisopilosina	6
1.4	O papel dos macrófagos na imunidade inata	8
1.5	As células imortalizadas e os estudos funcionais	10
1.6	Justificativa do estudo	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Delineamento Experimental	16
3.2	Tipo de estudo	16
3.3	Cultivos de micróglias imortalizadas	17
3.4	Epiisopilosina	18
3.5	Determinação da viabilidade celular pela redução do MTT	18
3.6	Determinação da viabilidade celular por quimioluminescência	19
3.7	Determinação da aderência celular	19
3.8	Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	20
3.9	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	20
3.10	Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos	21
3.11	Avaliação da produção de citocinas Th1/Th2 e Th17	21
3.12	Determinação da capacidade fagocitária	22
3.13	Avaliação da produção de radical superóxido	23
3.14	Análise estatística	23

4	RESULTADOS	24
4.1	Avaliação da viabilidade das micróglias	25
4.1.1	Redução do MTT por células C20	25
4.1.2	Quimioluminescência	25
4.2	Avaliação da viabilidade das células BV-2	26
4.3	Determinação do percentual de células C20 aderidas	28
4.4	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	28
4.4.1	Células não estimuladas	28
4.4.2	Células estimuladas com PMA	28
4.5	Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)	29
4.5.1	Células não estimuladas	29
4.5.2	Células estimuladas com LPS	30
4.5.3	Células estimuladas com TNF	30
4.5.4	Células estimuladas com LPS + TNF	30
4.6	Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos	32
4.6.1	Células não estimuladas	32
4.6.2	Células estimuladas com LPS	32
4.6.3	Células estimuladas com LPS + TNF	32
4.7	Avaliação da produção de citocinas	34
4.7.1	Células não estimuladas	35
4.7.2	Células estimuladas com LPS	35
4.8	Avaliação do tempo de incubação da epiisopilosina na função celular	36
4.8.1	Capacidade fagocitária	36
4.8.2	Radical superóxido – Teste do NBT	38

4.9	Sumário dos resultados	40
5	DISCUSSÃO	41
5.1	Considerações sobre o metabolismo mitocondrial e a produção de espécies reativas	42
5.2	Considerações sobre corpúsculos lipídicos e citocinas	48
5.3	Considerações sobre a expressão de receptores de aderência celular	51
5.4	Considerações a capacidade fagocitária	52
5.5	Considerações finais	54
6	CONCLUSÃO	55
7	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. A prospecção de moléculas bioativas

No processo da produção de medicamentos, certamente a prospecção de novas moléculas constitui um grande desafio para os pesquisadores, pois, de um lado tem-se diferentes tipos de agentes infecciosos, doenças e condições clínicas que demandam novos medicamentos, do outro lado, tem-se a aquisição de mecanismos de resistência por parte dos agentes infecciosos e os mecanismos de tolerância imunológica a esses medicamentos (Daley & Cordell 2021).

As doenças tropicais negligenciadas (DNTs) são doenças historicamente depreciadas a décadas, que afetam em grande maioria as populações destituídas de recursos básicos nos países em desenvolvimento, e devido a globalização se tornou um problema mundial de saúde. Segundo a organização mundial de saúde (OMS) mais da metade da população mundial se encontra em risco para doenças tropicais e muitas vezes o tratamento de grande parte dessas doenças são tóxicos, ineficazes e de alto custo financeiro (Mackey et al. 2014).

É estimado que as DTNs afetam 1,5 bilhão de pessoas ao ano em todo o mundo e que sejam responsáveis por pelo menos 500.000 mortes ao ano ou possuam potencial de dano a longo prazo causando efeitos negativos sobre a economia, educação e aos sistemas de saúde. Doenças como a malária, doença de chagas, leishmaniose, filariose, esquistossomose, hanseníase, entre outras, constituem exemplos significativos de doenças que possuem a problemática e a necessidade de desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Daley & Cordell 2021).

Apesar da gravidade das doenças negligenciadas, a emergência e reemergência de doenças infecciosas, pouco se discute sobre a criação de novos fármacos e, no que se refere à prospecção de novas moléculas, o Brasil constitui uma fonte inesgotável por possuir grande biodiversidade na sua fauna e flora, sendo crescente a identificação de produtos derivados de compostos naturais com possíveis atividades farmacológicas (Daley & Cordell 2021; Oliveira et al. 2011).

Um ponto relevante no desenvolvimento de novas moléculas é também o uso excessivo de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que constituem uma das classes mais prescritas em todo o mundo, em parte pela alta prevalência de dores crônicas na população. Embora sejam eficazes, o uso indiscriminado desses medicamentos leva a efeitos colaterais graves do trato gastrointestinal que incluem

ulceração, perfuração e hemorragia, realçando ainda mais a necessidade de buscar novas moléculas como alternativa terapêutica (Mendes et al. 2012; Rocha et al. 2019; Batlouni 2010).

O uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica é uma prática atuante desde os primórdios da evolução humana e é cada vez mais utilizado em meio aos profissionais de saúde. É estimado que 88% da população proveniente de países em desenvolvimento utiliza de recursos de extratos de plantas medicinais para tratamento de diversas doenças (Ferreira et al. 2019).

O uso de metabólitos de plantas como alvo de estudos tem sido importante no descobrimento de novas moléculas com diversas atividades biológicas que poderiam ser investigadas para posterior uso farmacológico, principalmente quanto a imunomodulação do sistema imune em doenças com alto potencial inflamatório que carecem de drogas que sejam econômicas e biologicamente viáveis (Catanzaro et al. 2018).

Existe atualmente uma alta carga de doenças globais e junto a ela, uma grande necessidade de estudos com moléculas naturais que possuam atividade biológica para desenvolvimento de novos fármacos que atendam essa demanda. Os alcaloides são recursos que atendem requisitos a serem examinados para tal. É estimado que atualmente aproximadamente 60 alcaloides de origem vegetal são aprovados como drogas farmacológicas em diversos países, entretanto a cada 50 famílias de plantas, 3 ou menos alcaloides foram caracterizados (Daley & Cordell. 2021).

1.2. Alcaloides

Os alcaloides constituem um grupo amplo de moléculas que possuem natureza básica e contém um ou mais átomos de nitrogênio geralmente em combinação com um sistema cíclico, essa ligação com amina pode ocorrer de forma primária, secundária ou terciária (RNH_2), (R_2NH) e (R_3N), respectivamente. Essas moléculas fazem parte de uma classe de produtos metabólicos secundários que podem ser encontrados em aproximadamente 300 espécies diferentes de plantas, além de animais e fungos. Esses compostos são divididos em 3 grupos principais: verdadeiros, proto-alcaloides e pseudo-alcaloides (Casciaro et al. 2020).

Ao contrário do pseudo-alcaloide, a principal característica dos verdadeiros e proto-alcaloides é a presença de um aminoácido como precursor e o que difere esses últimos é a presença do átomo de nitrogênio (N) dentro do heterociclo. Devido sua ampla diversidade estrutural, os alcaloides podem ser subdivididos em 14 grupos, dentre eles os pirróis, piridinas, tropanos, indóis e imidazóis (Casciaro et al. 2020).

Os alcaloides estão presentes nas pimentas (capsaicina, piperina), psicoativos (psilocina), no café (cafeína), chás, guaraná, nos medicamentos comerciais (morfina, pilocarpina, atropina, quinina, entre outros) e nas drogas de abuso (nicotina e cocaína), que nesse caso, impactam negativamente os sistemas de saúde (Daley & Cordell 2021).

A atividade biológica dos alcaloides que vem sendo cada vez mais explorada se deve a capacidade de interação dessas moléculas com receptores e proteínas celulares (Debnath et al. 2018) e atividades antimicrobianas, antiparasitárias, antivirais, antiinflamatórias e imunomoduladoras tem sido relatado com moléculas alcaloides de diferentes procedências (Casciaro et al. 2020; Mengarda et al. 2020; Araujo et al. 2017; Bhambani et al. 2021).

Uma atividade importante para a descoberta de novas moléculas farmacológicas antiinflamatórias possuem foco na imunomodulação, e muitos alcaloides foram descritos como imunomoduladores. O estudo de Sunila (2004) por exemplo, relata que o tratamento de camundongos *Balb/c* com o alcalóide denominado piperina obtido da espécie *Piper longum* causou leucocitose, maior atividade da medula óssea e aumento da produção de anticorpos circulantes.

Outro estudo demonstrou que a piperina encontrada na *Piper nigrum*, também conhecida como pimenta preta, estimulou a produção de IL-2 (interleucina 2) em baixas concentrações, mas reduziu em altas concentrações, além de inibir a produção de INF- γ (interferon gama) em células mononucleares (Chuchawankul et al. 2012).

Xue (2008) descreveu que o alcalóide Tetrandrina, proveniente da herbácea *Stephania tetrandra*, inibiu a ativação microglial induzida por LPS (lipossacarídeo), diminuição da produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e inibição da via NF-kB (Fator nuclear kappa B). Outro alcalóide

encontrado na planta *Sinomium acutum*, a sinomenina, demonstrou efeito preventivo contra rejeição de transplantes cardíacos (Mark et al. 2003).

A pipartina, alcalóide isolado da *Piper longum* também vem demonstrando efeitos imunomoduladores com capacidade anti-inflamatória, como a redução da produção de óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 β (IL-1 β), porém atenua a atividade da via NF- κ B por macrófagos estimulados por LPS; esse alcaloide tem o potencial de diminuir proliferação de células leucêmicas desencadeando apoptose e necrose de células tumorais (Bezerra et al. 2006; Huang et al. 2021).

As plantas medicinais provenientes das famílias Piperaceae e Rutaceae são nativas da América Central e América do Sul que começaram a ser avaliadas quanto ao seu efeito estimulador em órgãos secretores em meados de 1870. O gênero *Pilocarpus spp.* é constituído por 16 espécies, destas, 11 ocorrem exclusivamente no território brasileiro e são conhecidas popularmente como jaborandis (Lima et al. 2017; Santos & Moreno 2004).

Os jaborandis são arbustos com flores simétricas encontrados nas regiões norte (Pará e Mato grosso) e nordeste do país (Piauí e Maranhão), que crescem facilmente em afloramentos rochosos e lugares que possuem alta intensidade luminosa. Essas espécies vegetais são uma grande fonte de alcaloides, as plantas utilizam dessas moléculas como defesa contra pragas, predadores, entre outros estresses (Rocha et al. 2017).

A espécie *Pilocarpus microphyllus* (Figura 1), em especial, apresenta grande valor comercial por constituir a única fonte natural da pilocarpina, um alcalóide imidazólico de baixa toxicidade (Hendrickson et al. 2004) utilizado na contração da pupila e no tratamento de certos tipos de glaucoma (Pinheiro 2002; Guimarães et al. 2018), bem como, o chá de suas folhas é popularmente utilizado no tratamento da febre, distúrbios renais, psoríase, gota e bronquite (Santos & Moreno 2004).

Os estudos clínicos e farmacocinéticos mostraram que a pilocarpina possui meia-vida de 0,76 a 1,3 horas, sendo predominantemente hidrolisada a ácido pilocárpico no soro e no fígado ou por mecanismo oxidativo também no fígado (Ellis et al. 1972; Tanzer et al. 1995; Aromdee et al. 1996; Wiseman & Frauds 1995).

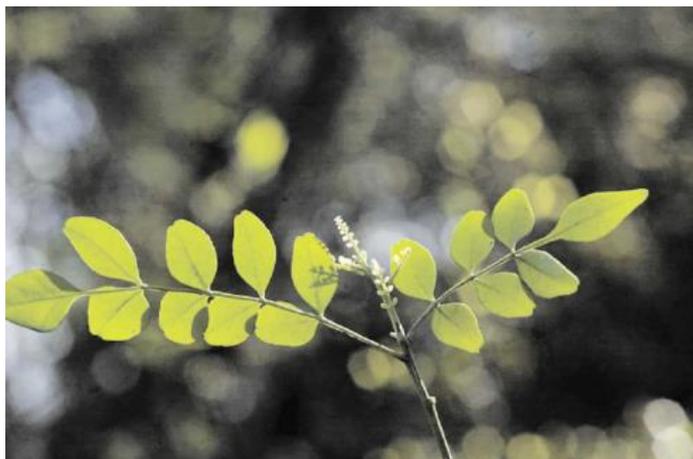


Figura 1. Fotografia da espécie *Pilocarpus microphyllus*. Fonte: Lima et al. 2017.

1.3. Epiisopilosina

Os alcaloides oriundos do *Pilocarpus spp.* são principalmente imidazóis e da espécie *P. microphyllus* obtem-se diferentes metabólitos secundários bioativos que ainda são pouco elucidados, dentre os quais vem se destacando a epiisopiloturina (EPI) e epiisopilosina (EPIIS) que são isômeros e estruturalmente similares à pilocarpina. Do ponto de vista dos efeitos biológicos, esses alcaloides possuem propriedades anti-helmíntica, antibacterianas e anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (Silva et al. 2013; Rocha et al. 2017; Carvalho et al. 2018; Guimarães et al. 2018; Rocha et al. 2019).

A EPI foi descrita por suas propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas em inflamação e dor induzidas em camundongos, além disso, acredita-se que a EPI age como um imunomodulador, reduzindo mediadores inflamatórios ou bloqueando receptores que ativam a inflamação (Silva et al. 2013).

O alcaloide imidazólico epiisopilosina (EPIIS) foi descrito pela primeira vez por Tedeschi (1973) e, apesar dos poucos estudos, sabe-se que a molécula apresenta baixa citotoxicidade *in vitro* e *in silico* com células de linhagem imortalizadas, e não apresenta toxicidade aguda *in vivo* para camundongos *Swiss*, que mesmo após altas administrações, não alterou os parâmetros hematológicos e bioquímicos, além de ser um promissor fármaco para o tratamento da esquistossomose (Guimarães et al. 2018; Guimarães et al. 2015).

Apesar de não apresentar indícios de atividade antibacteriana contra algumas espécies de bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *Enterococcus faecalis*) e gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), a EPIIS tem se apresentado como um potencial antihelmintico contra *Schistomoma mansoni*, a molécula atuou interrompendo o acasalamento entre fêmeas e machos *in vitro* e além disso, não apresentou toxicidade contra células imortalizadas de macaco (células vero) em baixas concentrações (Rocha et al. 2017).

Embora as propriedades biológicas da EPIIS sejam em grande parte desconhecidas, há indícios de que ela apresenta efeito colinérgico *in vivo*, sugerindo ação farmacológica no sistema nervoso central e autônomo parassimpático; estudos recentes indicam que esse alcalóide pode atuar contra uma importante enzima do vírus SARS-CoV-2 (Lucio et al. 2000; Sá et al. 2021).

Como dito, os alcaloides EPI e EPIIS foram relatados como inibidores da produção de mediadores inflamatórios, possivelmente por inibir vias inflamatórias importantes. Sousa et al. (2023) mostrou que em células BV2 (microglia murina), 1 a 100 µg/mL/1h de EPI causou inibição da produção de NO, enquanto que 25 µg/mL/24h diminuiu a produção de IL-6 e TNF-α, quando induzida por LPS.

Outros estudos relataram ausência de citotoxicidade *in vitro* para células de linhagem HaCat (queratinócitos humanos) e NIH3T3 (fibroblastos murinos) para a EPIIS, além de demonstrar também atividade contra *Shistosoma mansoni*. Esse mesmo estudo mostrou ausência de toxicidade aguda em camundongos e ausência de sinais clínicos como por exemplo, cianose, dor, tremor, diarreia foi evidenciado. (Guimarães et al. 2018; Rocha et al. 2019).

Rocha (2019) evidenciou também em seus estudos que a EPIIS não altera a viabilidade celular e nem aumenta produção de LDH, bem como preveniu a ativação da via de inflamação NF-kB. Além disso, é descrito que a EPIIS reduziu a produção de espécies reativas de nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos humanos.

O conjunto desses achados mencionados a respeito desses alcaloides torna a EPIIS um importante alvo de estudos para investigar seus efeitos imunomoduladores (Rocha et al. 2019). A molécula pode estar relacionada com ações anti-inflamatórias, o que seria interessante para proteger um organismo de doenças que venham causar reações inflamatórias exacerbadas ao decorrer do

dano; essas descobertas coletivas realçam a relevância desse alcaloide como alvo crucial para futuras aplicações biomédicas.

1.4. O papel dos macrófagos na imunidade inata

A resposta imunológica é dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A resposta imune inata também denominada resposta inespecífica está presente desde os primeiros meses de vida de um ser humano. Diferentemente da resposta adaptativa, ela independe de contato prévio com antígenos para sua ativação, sendo composta por um conjunto de células (monócitos/macrófagos, granulócitos e linfócitos citotóxicos naturais), moléculas do complemento e barreiras epiteliais (Beutler 2004).

Os macrófagos são os principais componentes da imunidade e estão distribuídos por todo o organismo, se originam na medula, circulam pela periferia como monócitos e após a ativação migram para o tecido para realização de sua função. São morfologicamente diversos e possuem nomenclaturas diferentes a depender de sua localização, como por exemplo, histiócito no tecido, células de Kupffer no fígado e micróglia no sistema nervoso central (Beutler 2004; Shapouri-Moghaddam et al. 2018); sua principal função é a fagocitose e a apresentação de antígenos aos linfócitos (Cruvinel et al. 2010).

Além dessas funções primordiais, os macrófagos também são responsáveis pela secreção de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios. Essa liberação ocorre após ativação pelo reconhecimento do antígeno através de diferentes receptores denominados receptores de reconhecimento padrão (RRPs), que reconhecem estruturas moleculares presentes nos micro-organismos denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs); lipossacarídeos, manose e ácido tecóico são exemplos dessas moléculas (Cruvinel et al. 2010).

Uma característica importante componente dos macrófagos é a presença de receptores específicos denominados receptores de *Toll-like* (TLRs), estes são capazes de reconhecer os PAMPs (lipopeptídeos bacterianos, β -glucanos e lipopolissacarídeos) presente nos agentes infecciosos (Kawai & Akira 2010). Durante a resposta inflamatória os macrófagos atuam, também, liberando espécies reativas de oxigênio (EROS), espécies reativas de nitrogênio (ERNS), quimiocinas,

citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias a depender da sua polarização, que os divide em M1 (macrófagos tipicamente pró-inflamatórios) e M2 (macrófagos anti-inflamatórios) (Cruvinel et al. 2010; Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

A inflamação é o processo pelo qual o sistema imunológico responde a um determinado dano ou estímulo e envolve uma complexa cascata de eventos, em que, uma série de citocinas, quimiocinas e células migram para o sítio afetado visando a eliminar ou minimizar o dano causado (Etienne et al. 2021).

O NF- κ B é um fator de transcrição que regula quase 500 genes e é composto por uma rede de pequenas proteínas intracelulares denominadas p65, p50/p105 e p52/p100, que quando ativadas, formam heterodímeros capazes de se ligar ao DNA da célula e iniciar a resposta ao estímulo (Shih et al. 2015; Mitchell & Hoffmann 2016). Dessa forma, a via NF- κ B é responsável por regular componentes inflamatórios importantes como a enzima ciclooxigenase (COX)-2, 5-lipoxigenase ciclooxigenase (COX)-2, 5-lipoxigenase (LOX), NO sintase induzível (iNOS) e citocinas como a IL 6 e TNF, isso o torna um alvo importante quando da prospecção de novas moléculas (Shih et al. 2015; Mitchell & Hoffmann 2016).

As citocinas são proteínas de sinalização envolvidas na comunicação entre as células da resposta imunitária. Os macrófagos M1 possuem indução pró-inflamatória por estímulos moleculares como por exemplo, IFN- γ e TNF- α ou LPS, permitindo assim a secreção de interleucinas importantes como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23, sendo eficazes na defesa contra patógenos e na produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase gerando EROS. Por outro lado, os macrófagos do tipo M2 secretam citocinas anti-inflamatorias como a IL-10 e TGF- β (Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

Ambas as respostas dos macrófagos, M1 ou M2, quando são hiperativadas podem causar dano tecidual como nas imunopatogenias. Isso é, sobretudo, importante no tecido cerebral que apresenta-se protegido dos infiltrados leucocitários e depósito de anticorpos. A principal célula de defesa no tecido nervoso é a micróglia, um macrófago especializado que desempenha suas funções em células em degeneração e/ou agentes infecciosos (Bachiller et al. 2018).

A hiperativação das micróglias pode estar envolvida em diversas doenças neurodegenerativas graves, como por exemplo, doença de parkinson (DP), doença de Alzheimer (DA) e demência causada pelo vírus HIV (HAD). Essas

células após serem ativadas se tornam excelentes na apresentação de antígenos aos linfócitos T nas suas moléculas de MHC I e II (Garcia-Mesa et. 2017).

As imunidades inata e adaptativa são complementares e, apesar de sua alta eficácia e especificidade, podem gerar distúrbios com alto dano, como as imunopatologias, imunodeficiências e autoimunidade. Nesse sentido, a busca por moléculas imunomoduladoras tem sido alvo de estudos. Assim, inúmeros metabólitos fitoquímicos tem mantido o foco em observar a capacidade antioxidante e de modulação dos sistemas (Behl et al. 2021).

As moléculas imunoestimuladoras são eficazes contra doenças infecciosas de diversos espectros e podem funcionar como agente imunoterapêutico para doenças imunossupressoras, mas devido sua baixa duração, devem ser readministradas. Já os imunossupressores podem ser utilizados em doenças que causam alto teor inflamatório que possuam dano alto ao organismo e os adjuvantes podem por exemplo, auxiliar no aumento de produções favoráveis de forma gradual (Behl et al. 2021).

Os fitoquímicos são metabólitos secundários obtidos de plantas que podem possuir ações e funções distintas, são divididos por classes denominadas carboidratos, lipídios, alcaloides, terpenóides, entre outros. Os alcaloides são uma grande fonte de moléculas que já foram inspiração para o desenvolvimento de diversas drogas antibacterianas como por exemplo o metronidazol e bedaquilina e que desempenham funções imunomoduladoras importantes que quando consumidos podem apresentar diversas atividades diferentes (Behl et al. 2021; Cushie et al. 2014).

1.5. As células imortalizadas e os estudos funcionais

Estudos sobre a funcionalidade dos macrófagos é fundamental para estabelecimento dos mecanismos de homeostasia e esse tipo celular está envolvido em diversos distúrbios metabólicos, imunes e infecções diversas, por essa razão essas células se tornam foco de estudos de estratégias terapêuticas por meio da modulação de sua resposta (Gutbier et al. 2020).

Os cultivos de células primárias obtidas de humanos e/ou animais são excelentes modelos para os estudos funcionais por potencialmente simular a resposta natural. Apesar disso, esses estudos demandam um grande número de

células e doadores para garantir maior variabilidade da resposta para permitir a translação dos resultados obtidos dos ensaios *in vitro* (Gutbier et al. 2020).

Uma alternativa aos cultivos primários tem-se os cultivos de células imortalizadas. A utilização de células de linhagem revolucionou a pesquisa científica em amplos aspectos, auxiliando em sínteses de proteínas, produção de vacinas, descobertas de mecanismos internos e metabolismos envolvidos, auxiliando por exemplo, no descobrimento de como moléculas potencialmente bioativas podem interagir em um organismo (Kaur et al. 2012).

As células de linhagem imortalizadas ainda constituem um modelo excepcional e são comumente utilizadas em estudos básicos devido sua capacidade de simular um organismo vivo, dispensando os obstáculos e quesitos quanto a ética de utilizar estudos em organismos humanos e animais. Esses modelos celulares diminuem o custo das pesquisas, permitem a padronização facilitada dos ensaios, são de cultivo fácil, fornecem uma quantidade ideal de células sincronizadas e permitem a reprodutibilidade dos estudos (Kaur et al. 2012).

Apesar de ser uma ótima ferramenta de estudos, essas células podem não fornecer representação adequada de células primárias e, por se tratar de células geneticamente modificadas, podem apresentar diferença significativa na resposta a determinados estímulos, expressão de moléculas, alterações fenotípicas e de função a ser exercida de maneira diferente entre ambas, fornecendo resultados conflitantes. Ainda, pelo grande número de repiques essas células podem apresentar padrões diferentes e/ou mutações em função de estímulos e/ou contaminações. Embora sejam diferentes dos cultivos primários, essas células constituem ainda um dos melhores modelos para os estudos pré-clínicos para determinar os efeitos e/ou curvas de dose-resposta (Kaur et al. 2012; Gutbier et al. 2020).

Tem sido reportados inúmeros tipos celulares imortalizados como, células epiteliais alveolares, nasofaríngeas, cerebrais, hepáticas e de macrófagos derivados de medula óssea (Kemp et al. 2008; Yip et al. 2013; Yi et al. 2023; Ramboer et al. 2014; Ramon-Vazquez et al. 2019). Uma outra célula importante e de difícil obtenção, é a micróglia imortalizada por Garcia-Mesa (2017) a partir de tecido cortical humano com a finalidade de aprimorar estudos imunológicos. Essas células possuem filamentos alongados, são facilmente cultivadas *in vitro*, são

semelhantes as células primárias e, por se tratar de um macrófago, é um excelente modelo de investigação anti-inflamatória de moléculas bioativas.

1.6. Justificativa do estudo

Dada a demanda por novos fármacos que tem sido evidenciada pelas inúmeras doenças infecciosas, pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos agentes infecciosos e pela toxicidade medicamentosa, é fundamental a prospecção de novos compostos bioativos como fontes alternativas para o tratamento dos diferentes tipos de doenças. Nesse contexto, o alcalóide obtido da espécie *Pilocarpus microphyllus* é um candidato promissor pelas suas propriedades anti-inflamatórias conhecidas, mas sobretudo, pelo seu potencial como agente imunomodulador da resposta imunitária inata dos macrófagos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes concentrações do alcaloide epiisopilosina na função inata de macrófagos/micróglias imortalizadas humana e murina.

2.2 Objetivos específicos

- Determinação da viabilidade das células C20 e BV2 incubadas com diferentes concentrações do alcaloide epiisopilosina e definição das concentrações baixa, intermediária e alta;
- Determinar e avaliar o percentual de células aderidas sobre lamínulas;
- Determinar e avaliar a capacidade fagocitária;
- Determinar e avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs);
- Determinar e avaliar a produção de corpúsculos lipídicos;
- Determinar e avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental

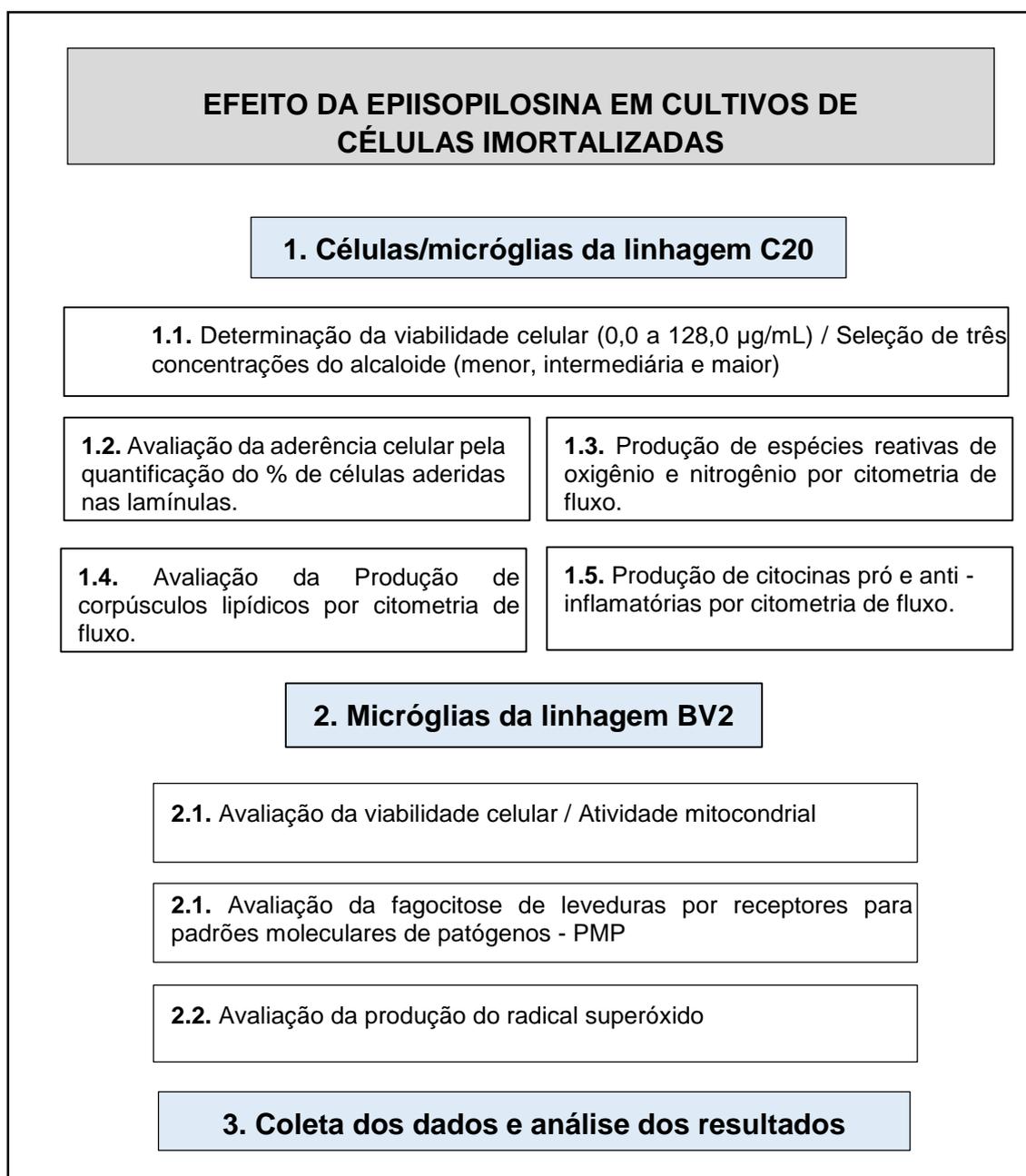


Figura 2. Fluxograma dos ensaios

3.2. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental, descritivo e *in vitro* para determinar o efeito biológico da episipilosina em células imortalizadas da linhagem C20 (micróglia humanas) e BV2 (Micróglia murinas). O estudo foi realizado nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada – NuPMIA da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

3.3. Cultivos de micróglia imortalizadas

A linhagem celular C20 deriva de micróglia humana originariamente obtida por David Alvarez-Carbonell (Case Western Reserve University), a partir do isolamento da micróglia primária do cérebro humano, seguido da sua imortalização com o antígeno T do vírus símio 40 (SV40 T) e da indução da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT). O clone representativo C20 foi caracterizado por expressão de marcadores de superfície e perfil de citocinas secretadas (Garcia-Mesa et al. 2017). A linhagem celular encontra-se criopreservada em nitrogênio líquido (-80 °C) no Laboratório de Imunologia Celular / NuPMIA da Faculdade de Medicina, UnB (Figura 3A).

A célula BV2, é uma micróglia murina proveniente do tecido cerebral de camundongos da espécie C57 com 1 semana de idade que foi imortalizada com vírus J2 carreando as proteínas oncogênicas v-raf/v-myc (Blasi et al.1990).

Para os ensaios, as células eram descongeladas em banho maria a 37 °C e cultivadas em garrafas de cultivos com membrana pequenas ou médias, em meio DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) suplementado com L-glutamina, 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de estreptopenicilina e mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C para as células C20 ou com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sem adição de L-glutamina para as BV2 (Figura 3B).

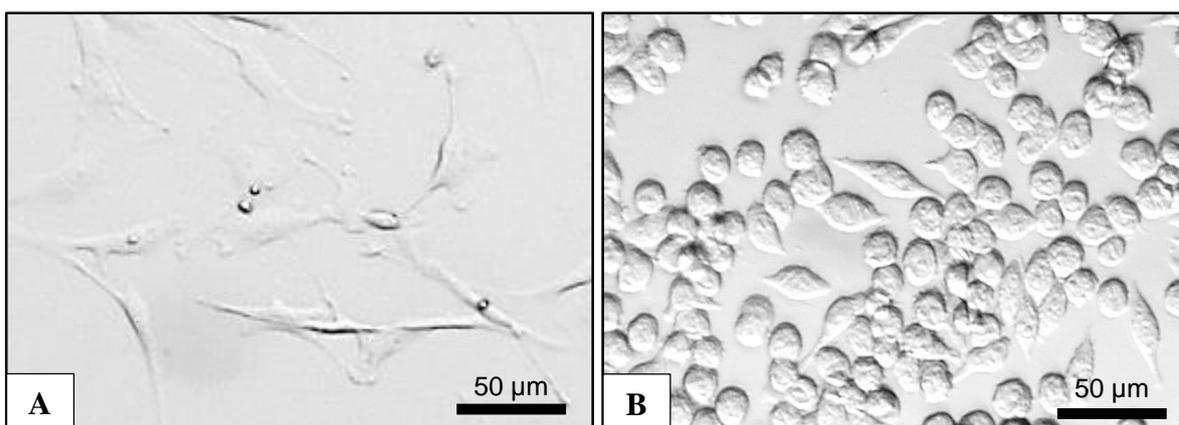


Figura 3. Fotomicrografias de cultivos de micróglia imortalizadas. Em A, células C20 (humana) e em B células BV2 (murina). As imagens foram obtidas no microscópio Nikon Eclipse Ts2 (Laboratório de Imunologia Celular, NuPMIA, FM/UnB).

3.4. Epiisopilosina

A Epiisopilosina, (EPIIS-[3S-[3 α (S*),4 β]-dihydro-3-(beta-hydroxybenzyl)-4-[(1-methyl-1H-imidazol-5yl)methyl]furan-2(3H)-one, (Rocha et al. 2017) é uma molécula alcaloide imidazólica de fórmula molecular C₁₆H₁₈O₃N₂ e peso molecular de 286,33 g/mol, encontrada nas folhas do jaborandi de espécie *Pilocarpus microphyllus*. O alcalóide EPIIS foi obtido a partir da biomassa de sais de pilocarpina pelo processo de acidificação e alcalinização (Veras et al. 2013). O isolamento foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a purificação realizada por espectrometria de massa (Guimaraes et al. 2018). A estrutura química da epiisopilosina é mostrada na figura 4.

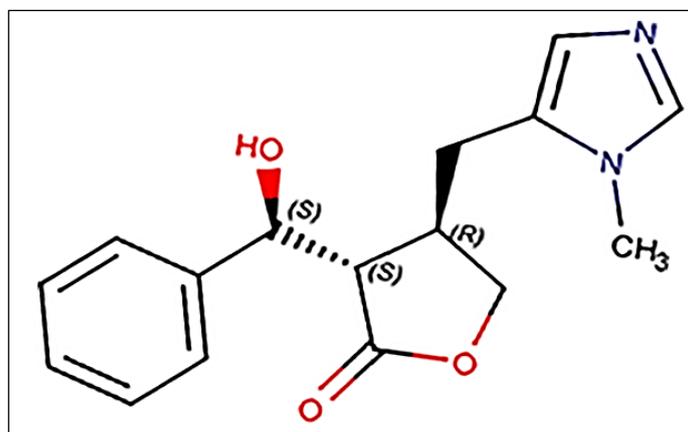


Figura 4: Estrutura química da epiisopilosina (C₁₆H₁₈O₃N₂) (Guimaraes et al. 2018).

3.5. Determinação da viabilidade celular pela redução do MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Sigma Aldrich, St Louis, 98%). O sal de MTT resulta em uma solução amarela que quando exposta a células metabolicamente ativas tem sua cor modificada para azul-violeta devido à redução desses sais a formazan, reação gerada por desidrogenases presentes na atividade mitocondrial, podendo então presumir viabilidade celular com base na respiração celular (Storcket et al. 2012). As células C20 ou BV2 foram semeadas em quintuplicata ou triplicata em placas de 96 poços com 50.000 células por poço e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 4 horas para aderência celular. Após esse período as células foram expostas as concentrações 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, e 128 µg/mL de EPIIS e mantidas nas mesmas condições por 2 (BV2) e/ou 24 horas (C20 e BV2). Após o tratamento com as diferentes concentrações da molécula, a placa foi

centrifugada, o sobrenadante descartado e foi adicionado o sal de MTT num volume de 100uL na concentração de 5 mg/mL, 4 horas depois foi adicionado 100uL da solução de DMSO e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 570 nm (Spectra Max® Plus 384).

3.6. Determinação da viabilidade celular por quimioluminescência

O ensaio de foi realizado com o kit CytoTox-Glo™ (Promega, Eua). Foram semeadas 30 mil células C20 em triplicata em uma placa de 96 poços de cor branco leitoso para impedir a passagem de luz. Após 4 horas de aderência adicionou-se a EPIIS nas concentrações 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL. A placa então foi mantida por 24 horas em estufa a 5% de CO₂ e após esse período o reagente foi adicionado em um volume de 50 µL e mantido sob agitação orbital por 15 minutos para atingir a sua sensibilidade máxima e, então, a emissão da quimioluminescência foi avaliada em luminômetro (Spectra Max® Plus 384).

O ensaio utiliza um pepídeo luminogênico como substrato denominado alanil-alanilfenilalanil-aminoluciferina para mensurar atividade de proteases de células mortas. O substrato não possui capacidade de atravessar membrana de células intactas, se tornando seletivo a células que possuem dano através de uma luciferase recombinante e após a ligação é possível mensurar o brilho através da luminescência (Niles et al. 2007).

3.7. Determinação da aderência celular

Para determinar o efeito da EPIIS na aderência das células C20, 100.000 células foram depositadas sobre lamínulas de vidro (13 mm), em quadruplicata, em placa de cultivo de 24 escavações, em meio DMEM F12 incompleto (sem adição de soro fetal bovino) e deixado por 4 horas para aderência celular, após esse período foi adicionado EPIIS nas concentrações 0,5, 4 ou 64 µg/mL. Após, submetido por 2 ou 24 horas de incubação a 37 °C em câmara de CO₂ (5%).

Depois as escavações foram lavadas, secas com ar quente, fixadas com metanol por 1 mim, secas novamente, coradas com solução de Giemsa a 10% por 10 minutos e montadas em lâminas de microscopia para avaliação em microscopia óptica (40x) por um único observador. O percentual de aderência celular foi estimado pela quantificação das células em 10% da área da lamínula utilizando-se

a objetiva de 40x do microscópio Olympus, modelo BX41 número 00228712; a área da lamínula equivale a 133 mm² (raio da lamínula = 6,5 mm) e a área da objetiva equivalente a 0,227 mm² (raio da objetiva = 0,269 mm). Assim, dividindo-se a área da lamínula pela área da objetiva, tem-se que cada lamínula equivale a 586 campos da objetiva de 40x, logo, as células foram quantificadas em 59 campos e os resultados expressos em percentual (Kuckelhaus 2007b).

3.8. Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

A determinação das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) foi realizada pela incubação das micróglia humanas (50 mil céls/escavação) tratadas ou não com 0,5, 4 ou 64µg/mL em sextuplicata, em placas de petri de fundo plano e 96 escavações, em meio DMEM F12 suplementado com 10% de SFB, em câmara de CO₂ a 37°C por 24 horas; 50 ng/mL de LPS, 50 U/mL de TNF e a associação entre ambos foram utilizados como estímulos. Decorrido esse tempo, 50 µL de uma solução de trabalho contendo sonda 4- amino-methylamino-2-7-difluororescein diacetato (DAF-FM diacetato) com STF 37°C e pH 7.2 foram incubadas por 1 hora, a membrana celular é permeável a esse composto e quando em contato com ERNs produz a 4-amino-methylamino-2-7-difluororescein (DAFFM).

Após a adição da sonda às escavações, a placa foi re-incubada nas mesmas condições descritas por 1 h em ausência de luz. A placa foi centrifugada a 2000 rpm e 50 µL do sobrenadante foi retirado e armazenado para posterior ensaio de citocinas (descrito no item 3.11). Em seguida, as escavações foram lavadas com STF 37°C, pH 7.2 para a homogeneização e posterior leitura no citometro LSR FortessaTM (BD, Biosciences Pharmingen, California, USA) com no mínimo 5 mil eventos. Os resultados foram então expressos em percentagem pelo FlowJo Software (Tree Star Inc).

3.9. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a quantificação das espécies reativas de oxigênio, 50.000 células/escavação foram distribuídas, em quintuplicata, em placa de 96 escavações com e sem presença de estímulo de peróxido de hidrogênio na concentração de 100 nM e incubadas em câmara úmida a 37°C, na presença de 5% de CO₂ em ar por 30 min. Como controle positivo da produção de EROS foi utilizado 40 nM de

PMA (acetato de forbol meristato). Decorrido esse tempo, 50 µL de uma solução de trabalho contendo sonda DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, ThermoFisher P36242) em STF 37°C, pH 7.2 foram adicionados às escavações e depois re-incubadas nas mesmas condições descritas por 30 min no escuro, em seguida, as escavações foram-homogeneizadas. A leitura foi realizada no citômetro LSR Fortessa™ (BD, Biosciences Pharmingen, California, USA) com no mínimo 10x10³ eventos. Os resultados foram-expressos em percentagem pelo FlowJo Software (Tree Star Inc); o PMA (12-miristato 13-acetato) foi utilizado como controle positivo.

3.10. Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos

Para avaliar a concentração de corpúsculos lipídicos, 50 mil células/escavação foram distribuídas, em sextuplicata, em placa de 96 escavações com ou sem 50 ng/mL de lipopolissacarídeos (LPS) como estímulo, incubadas em câmara de CO₂ a 37°C por 4 horas para aderência celular e após o tratamento com 0,5, 4 e 64 µg/mL por 24 h. Decorrido este período, 50 µL de uma solução de trabalho contendo sonda BODIPY 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene, ThermoFisher D3922) em STF 37°C, pH 7.2 foi adicionada às escavações e depois re-incubadas nas mesmas condições descritas por 1 h com ausência de luz. Em seguida, as escavações foram lavadas com STF 37°C, pH 7.2 para a homogeneização e leitura no citômetro LSR Fortessa™ (BD, Biosciences Pharmingen, California, USA) com no mínimo 5.000 eventos. Os resultados-expressos em percentagem pelo FlowJo Software (Tree Star Inc).

3.11. Avaliação da produção de citocinas Th1/Th2 e Th17

Para quantificar as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias foi obtido 50µL do sobrenadante do item 3.8 e mantido sob congelação (- 80 °C) antes das análises. Para tanto, foi utilizado o Kit Citokine Human Th1/Th2/Th17 (BD™ CBA, USA), conforme as especificações do fabricante. Esse kit possui um reagente de detecção e sondas de captura aos quais possuem tamanhos e anticorpos específicos para cada citocina a ser mensurada permitindo assim a detecção e análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, INF-γ e IL-17A.

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e então 25 µL foram transferidas, em triplicata, para Eppendorfs identificados, em seguida foram adicionados 50 µL das sondas de captura e 50 µL do reagente de detecção após homogeneização os mesmos foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente sob fotoproteção. Depois de adicionar 200 µL do tampão de lavagem, homogeneizar e centrifugar a 200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado e então, adicionados e homogeneizados 200 µL do tampão para reconstituir o volume final. Então, a leitura foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD™, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados obtidos das análises foram convertidos para concentração no programa *FCAP Array™ Software Version 3.0* (BD™, USA) e os resultados expressos em pg/mL.

3.12. Determinação da capacidade fagocitária

A função fagocitária foi avaliada em cultivos de células BV2, em duplicata, em placa de 24 escavações contendo lamínulas (13 mm) para a aderência das células. Assim, foram incubadas 200.000 céls/escavação em câmara de CO₂ a 5 % por 2 horas em 300 µL de meio DMEM F12 incompleto (sem adição de soro fetal bovino). Depois de lavadas para a remoção das células não aderidas, as células foram novamente incubadas nas mesmas condições por 24 horas na presença das concentrações 0,5, 4 e 64 µg/mL da EPIIS, na sequência, por mais 30 minutos na presença de uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (5 leveduras/célula) previamente incubadas com 10% de soro fetal bovino inativado - (fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos). Finalizada a incubação, a placa contendo as células foi centrifugada (10 min com 2000 rpm) e o sobrenadante delicadamente descartado. Depois, as células foram secas com ar aquecido, fixadas com metanol por 1 min, secas novamente e coradas com solução de Giemsa a 10% por 10 minutos. As análises foram feitas por um único observador ao microscópio óptico, pela quantificação de 200 células para determinar o percentual de células com leveduras internalizadas e o total de leveduras ingeridas. Os resultados foram expressos pelo Índice Fagocitário (IF) (média de leveduras ingeridas x percentual de células envolvidas na fagocitose).

3.13. Avaliação da produção de radical superóxido

A avaliação da produção de radicais livres foi realizada por meio do teste do NBT (Nitro blue tetrazolium) que é uma substância incolor, mas que na presença de radical superóxido é reduzida, adquirindo uma cor azulada (Choi et al. 2006). Assim, foram incubadas em duplicata 60.000 células BV-2 devidamente identificadas em uma placa de 24 poços com lamínulas redondas de vidro (13 mm) e deixadas 4 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ para a aderência. Após esse período as células foram incubadas com 0.0, 0.5, 4 ou 64 µg/mL por 2 horas ou 24 horas nas mesmas condições. Depois foi adicionado 50 µL da solução de NBT (50 mg/mL) por 30 minutos, a placa então foi centrifugada e o sobrenadante delicadamente removido.

Depois, uma gota de Hanks-triz com 40% de SFB foi adicionada a todas as escavações e, então, as células foram secas com ar quente, fixadas com metanol por um minuto, novamente secas e coradas com uma solução de safranina (1,4g em 100 mL água e 40 mL de glicerol) por 5 minutos. As células foram analisadas em microscopia óptica (1000 x de aumento) e os resultados expressos em percentagem de células da seguinte maneira: 1) redução basal (sem adição de leveduras); 2) células que reduziram o NBT e fagocitaram leveduras; 3) células que reduziram, mas não fagocitaram; 4) células que não reduziram, mas fagocitaram e; 5) células que não reduziram nem fagocitaram.

3.14. Análise estatística

A distribuição das variáveis (normalidade) foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a variabilidade das variáveis pelo teste de Bartlett. Para as múltiplas comparações (> de 2 grupos) foram utilizados o teste de ANOVA (normalidade, $p > 0,05$) ou Kruskal-Wallis (normalidade, $p < 0,05$) e duas amostras dependentes foram comparadas pelos testes t-pareado (normalidade, $p > 0,05$) ou Wilcoxon (normalidade, $p < 0,05$). Diferenças entre as variáveis foram significativas quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) for menor que 5% ($p < 0,05$). O programa Prism 5® software package (GraphPad, USA) foi utilizado para as análises e para a representação gráfica dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da viabilidade das micróglias

Para determinar a viabilidade das células C20 (24 horas) ou BV2 (2 e 24 horas) incubadas com diferentes concentrações de epiisopilosina utilizou-se o método colorimétrico da redução do sal de MTT (amarelo) a cristais de formazan (azul) pelas células viáveis e o método de emissão de quimioluminescência por células viáveis na presença da enzima luciferase fornecida conforme descrito anteriormente.

4.1.1. Redução do MTT por células C20

Os resultados obtidos através do MTT de cultivos de células C20 tratados com EPIIS apresentaram redução sem dose dependência em todas as concentrações testadas (0,5 a 128 µg/mL) quando comparados ao grupo controle. Os valores se apresentaram de forma parecida variando entre $60,30 \pm 16,27$ para a primeira concentração (0,5 µg/mL) e $69,42 \pm 11,38$ para a maior concentração (128 µg/mL) sendo a menor viabilidade encontrada na concentração 2 µg/mL (média $55,1\% \pm 15,9$) e a maior na concentração 128 µg/mL ($69,4 \pm 11,4$) (Figura 5A).

4.1.2. Quimioluminescência

Para validar os testes de viabilidade das células C20, foi utilizado o método de quimioluminescência com as mesmas condições utilizadas para o MTT, os resultados se comportaram de maneira diferente entre os testes com aumento da viabilidade nas concentrações testadas 0,5 µg/mL ($164,8 \pm 26,16$ % RLU), 1 µg/mL ($189,8 \pm 30,8$ % RLU), 2 µg/mL ($173,6 \pm 5,9$ % RLU) e 4 µg/mL ($285,4 \pm 33,71$ % RLU), 8 ($242,1 \pm 29,2$ % RLU), 16 µg/mL ($225,7 \pm 33,1$ % RLU) e 32 µg/mL ($207,1 \pm 13,5$ % RLU) e diminuição na concentração 128 µg/mL ($7,6 \pm 12,6$ % RLU); comparado ao controle basal, não houve alteração na viabilidade celular com 64 µg/mL ($91,7 \pm 97,5$ % RLU) (Figura 5B).

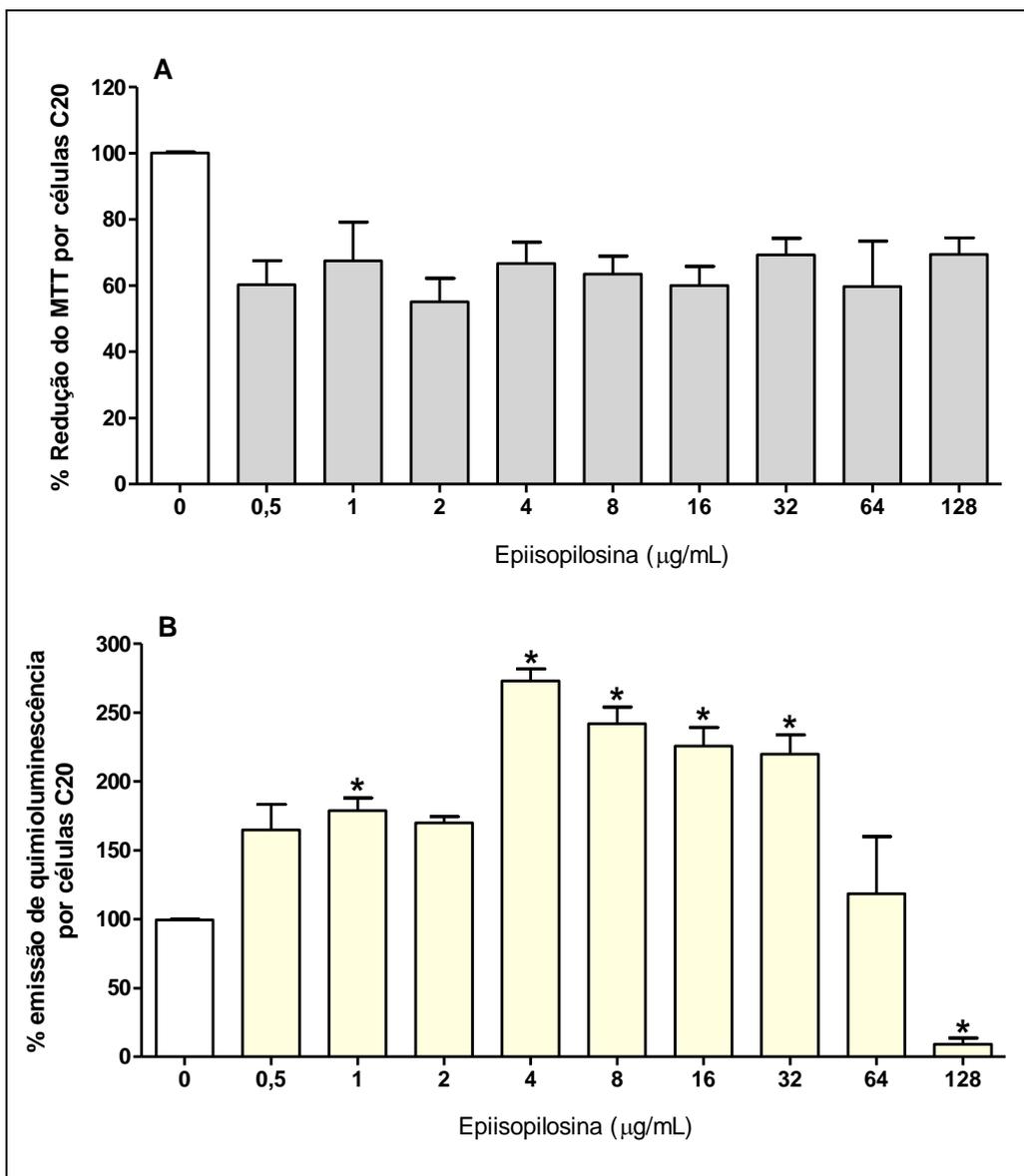


Figura 5. Percentual de células C20 viáveis incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de epiisopilosina (0 a 128 µg/mL) avaliada pela redução do MTT (A) e por quimioluminescência (B). Os resultados mostraram que a redução do MTT foi similar entre as células tratadas ou não com a epiisopilosina (ANOVA, $p > 0,05$), enquanto que pela quimioluminescência houve maior % de emissão nas escavações tratadas com 1 ou 4 a 32 µg/mL, mas houve redução com 128 µg/mL da substância, na comparação com o controle (0 µg/mL) (ANOVA, $p < 0,0001$). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

4.2. Avaliação da viabilidade das células BV-2

A incubação das células BV2 com diferentes concentrações de EPIIS por 2 horas resultou, em que, apenas a menor delas (0,5 µg/mL = 130,9% ± 19,1%) afetou o metabolismo mitocondrial das células, aumentando em ~31% na comparação com o controle (0,0 µg/mL = 100,0% ± 0,8%) (Teste t pareado, $p <$

0,05); as demais concentrações não afetaram a viabilidade celular/metabolismo mitocondrial, quando comparado ao controle (Teste t pareado, $p > 0,05$) (Figura 6A).

Diferentemente de 2 horas, a incubação das células BV2 por 24 horas mostrou que as três maiores concentrações aumentaram o metabolismo celular na comparação com o controle, sendo de $132,2\% \pm 5,5\%$ para $32 \mu\text{g/mL}$, de $116,9\% \pm 5,6\%$ para $64 \mu\text{g/mL}$ e de $126,5\% \pm 11,2\%$ para $128 \mu\text{g/mL}$ (Teste t pareado, $p < 0,05$); não houve diferença entre os percentuais do controle a as menores concentrações de EPIIS ($0,5$ a $16 \mu\text{g/mL}$) (Teste t pareado, $p > 0,05$) (Figura 6B).

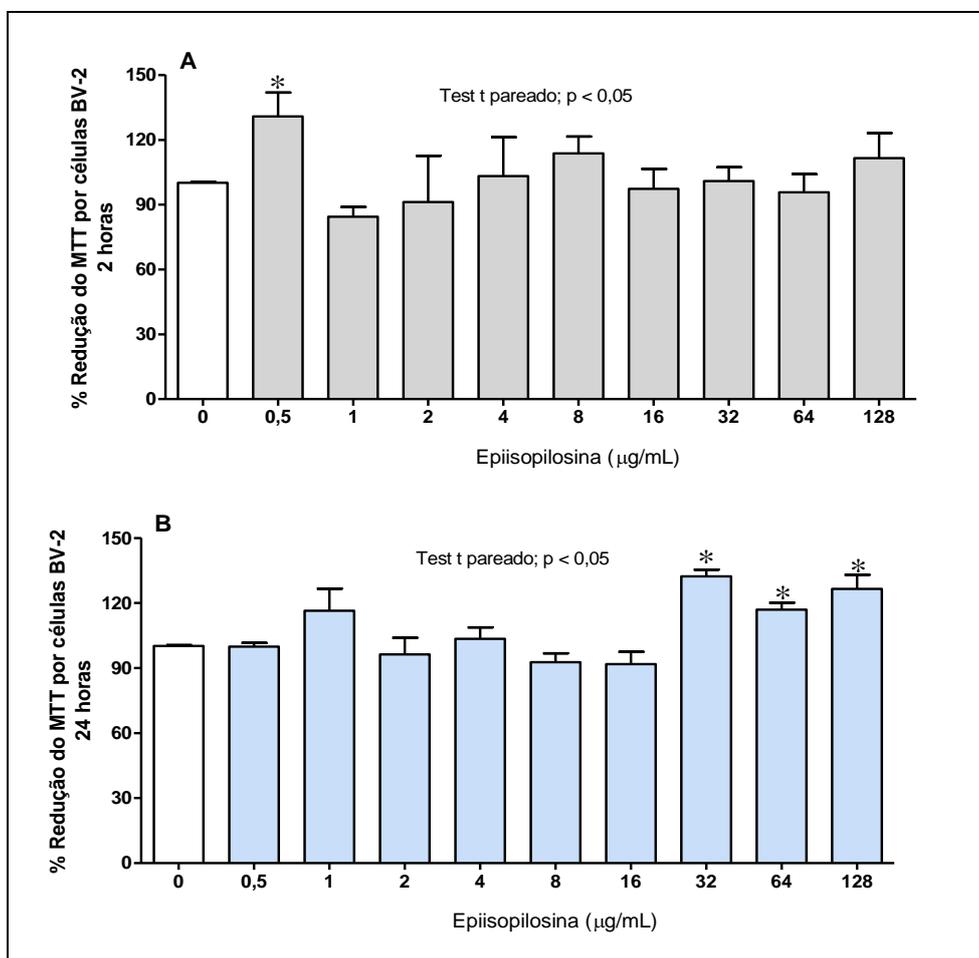


Figura 6. Percentual de células BV-2 viáveis incubadas por 2 (A) ou 24 (B) horas com diferentes concentrações de EPIIS (0 a $128 \mu\text{g/mL}$) avaliada pela redução do MTT. Os resultados mostraram que $0,5 \mu\text{g/mL}$ de EPIIS por 2 horas e as 3 maiores concentrações por 24 horas aumentaram o % de células que reduziram o MTT (Teste t pareado, $p < 0,05$), na comparação com o controle, as demais concentrações por 2 ou 24 horas não afetaram o metabolismo mitocondrial das células (Teste t pareado, $p < 0,05$). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

4.3. Determinação do percentual de células C20 aderidas

Para determinar o percentual de células aderidas sobre lamínulas, 100×10^3 células/escavação foram incubadas com diferentes concentrações de EPIIS por 24 horas. Os resultados mostraram redução no percentual de células aderidas nas escavações incubadas com $0,5 \mu\text{g/mL}$, $4 \mu\text{g/mL}$ e $64 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 7).

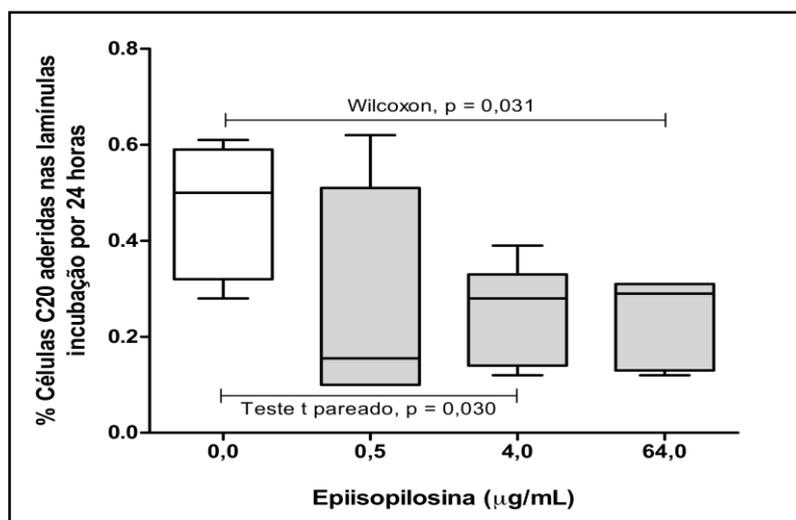


Figura 7. Percentual de células C20 aderidas nas lamínulas depois da incubação por 24 horas com diferentes concentrações de epiisopilosina. Os resultados mostraram que $4,0$ ou $64,0 \mu\text{g/mL}$ do alcaloide reduziu o percentual de células aderidas, em comparação com o controle ($0,0 \mu\text{g/mL}$). Acima, estão representadas as medianas, os quartis, os valores máximos e mínimos e os pontos extremos.

4.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

4.4.1. Células não estimuladas

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada por citometria de fluxo conforme descrito no item 3.9, as células foram submetidas ou não ao estímulo de PMA. Os dados obtidos demonstraram alterações significativas na produção de EROs nas condições estudadas. Houve aumento do controle basal de $149,4 \pm 32,6$ para $242,4 \pm 74,0$ na concentração mais baixa da molécula ($0,5 \mu\text{g/mL}$), $238,2 \pm 33,9$ com a concentração intermediária ($4 \mu\text{g/mL}$) e para $270,6 \pm 27,5$ para a concentração mais alta testada ($64 \mu\text{g/mL}$) (Figura 8A). Os resultados foram expressos em unidade %MFI.

4.4.2. Células estimuladas com PMA

Os dados obtidos das micróglia tratadas com $0,5$, 4 e $64 \mu\text{g/mL}$ que foram estimuladas com PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) se assemelham aos das

células que não possuíam estímulo. Houve um aumento da produção quando comparado ao controle basal ($149,4 \pm 32,6$) para as concentrações 0,5, 4 e 64 $\mu\text{g/mL}$ ($259,6 \pm 57,16$, $235,8 \pm 18,73$ e $276,6 \pm 28,38$, respectivamente) (Figura 8B).

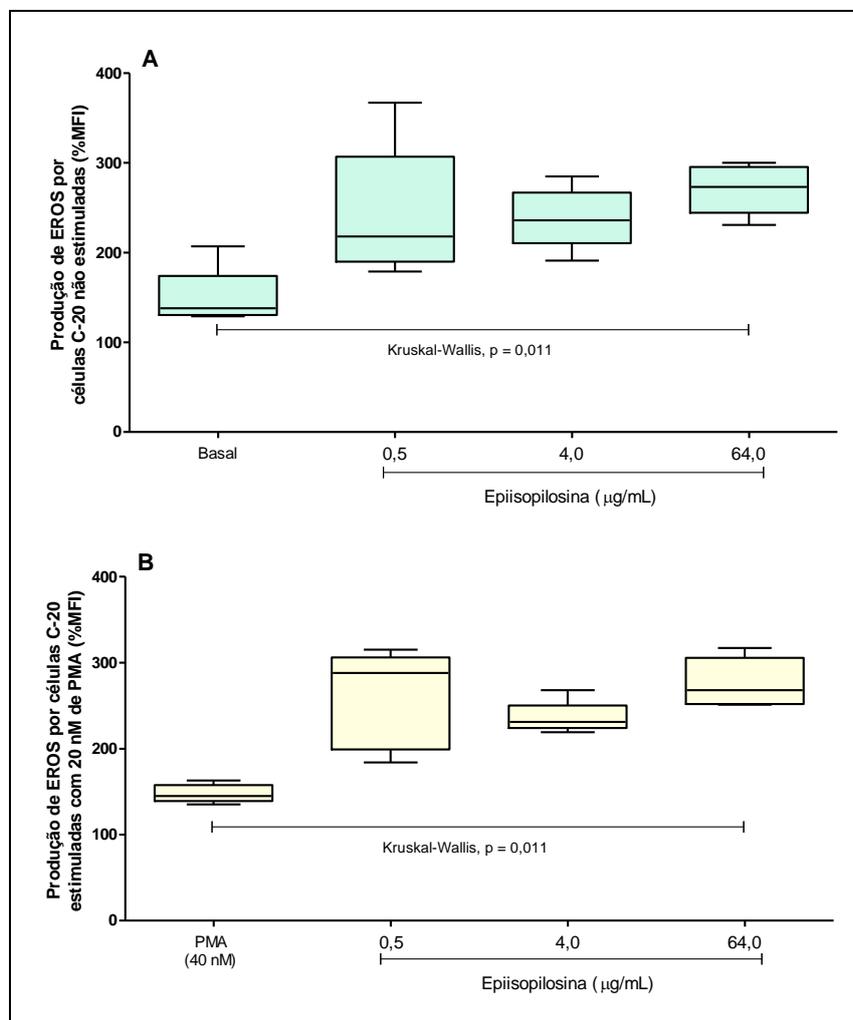


Figura 8. Produção de espécies reativas de oxigênio por células C20 tratadas com diferentes concentrações de EPIIS (0,5, 4 ou 64 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas, com e ou sem estímulo de PMA. Os resultados demonstraram que houve maior produção de EROS com 64,0 $\mu\text{g/mL}$ de EPIIS na comparação com o controle (0,0 $\mu\text{g/mL}$), com ou sem o estímulo com PMA. Estão mostrados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

4.5. Avaliação da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

Os resultados da produção de ERNS estão mostrados na figura 9.

4.5.1. Células não estimuladas

A produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) foi avaliada com ou sem estímulos na presença das concentrações 0,5, 4 e 64 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados

mostraram que a incubação com a maior concentração de EPIIS (64,0 µg/mL) aumentou a produção basal de ERNS (423 %MFI) na comparação com o controle (256,0 %MFI). As demais concentrações de EPIIS não afetaram a produção de ERNs, na comparação com o controle (0,5 µg/mL = 347,0 %MFI; 4,0 µg/mL = 299,0 %MFI) (Figura 9A).

4.5.2. Células estimuladas com LPS

A incubação das células com as três concentrações de EPIIS (0,5 µg/mL = 286,0 %MFI; 4,0 µg/mL = 294,5 %MFI; 64,0 µg/mL = 315,5 %MFI), quando estimuladas com LPS, não afetaram a produção de ERNs, na comparação com o controle (0,0 µg/mL = 278,5 %MFI) (Figura 9B).

4.5.3. Células estimuladas com TNF

As células quando estimuladas com TNF não apresentaram alteração na produção de ERNs quando incubadas com as três concentrações de EPIIS (0,5, 4 e 64 µg/mL), na comparação com o controle (323,5 %MFI), sendo 347,5 %MFI para a menor concentração (0,5 µg/mL), 361,5 %MFI para a concentração intermediária (4 µg/mL) e 339,0 %MFI para a maior concentração (64 µg/mL) (Figura 9C).

4.5.4. Células estimuladas com LPS + TNF

O tratamento com as concentrações de EPIIS descritas acima não afetou a produção de ERNs pelas células quando estimuladas com TNF e LPS associados na comparação com o controle (288,0 %MFI), sendo 300,5 %MFI (0,5 µg/mL), 288,0 %MFI (4 µg/mL) e 250,0 (64 µg/mL) (Figura 9D).

A figura 10 mostra a produção de ERNS pelas células C20 incubadas com os diferentes estímulos. Os resultados avaliados pelo teste t pareado mostraram que a produção basal dessa espécie reativa aumenta com 64 µg/mL de epiisopilosina. No entanto, essa produção de ERNS foi inibida com a adição de 50 ng/mL de LPS ou quando se adicionou LPS (50 ng/mL) acrescido com 50 U/mL de TNF ($p < 0,05$).

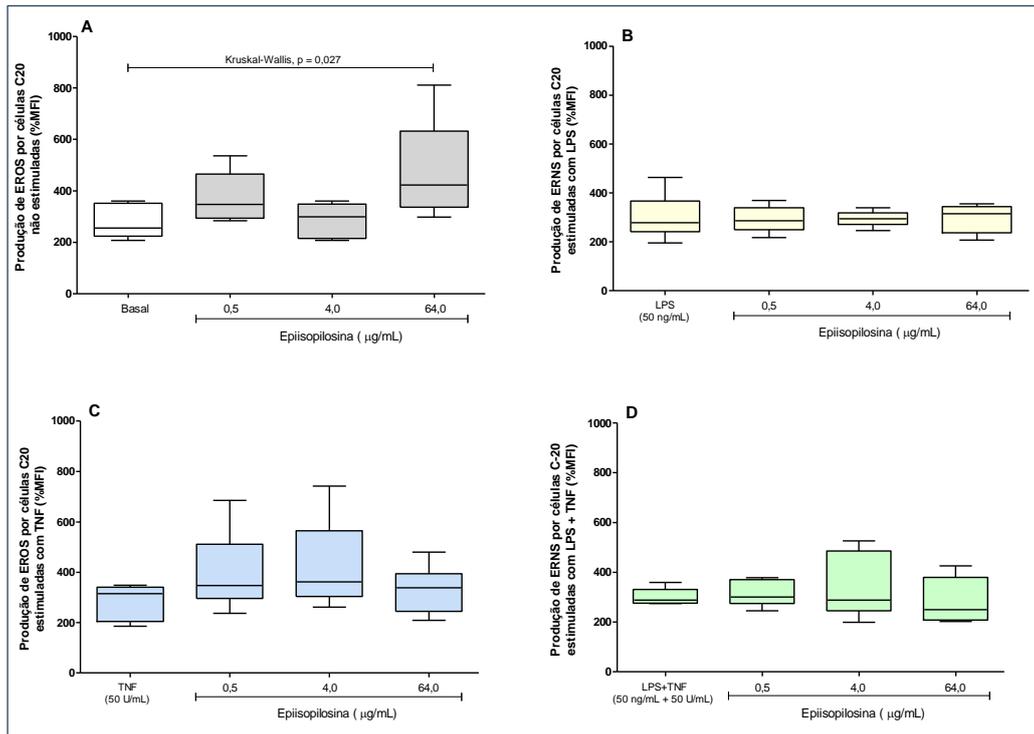


Figura 9. Produção de espécies reativas de nitrogênio por células C20 tratadas diferentes concentrações de EPIIS (0,5, 4 ou 64 µg/mL) por 24 horas, na presença ou não de diferentes estímulos (LPS, TNF, LPS+TNF). Os resultados mostraram que a incubação com a maior concentração de EPIIS (64,0 µg/mL) aumentou a produção basal de ERNS na comparação com o controle (A); a incubação das células com os diferentes estímulos não afetou a produção de ERNS quando estas foram incubadas com as três concentrações de EPIIS (B, C, D). Estão mostrados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

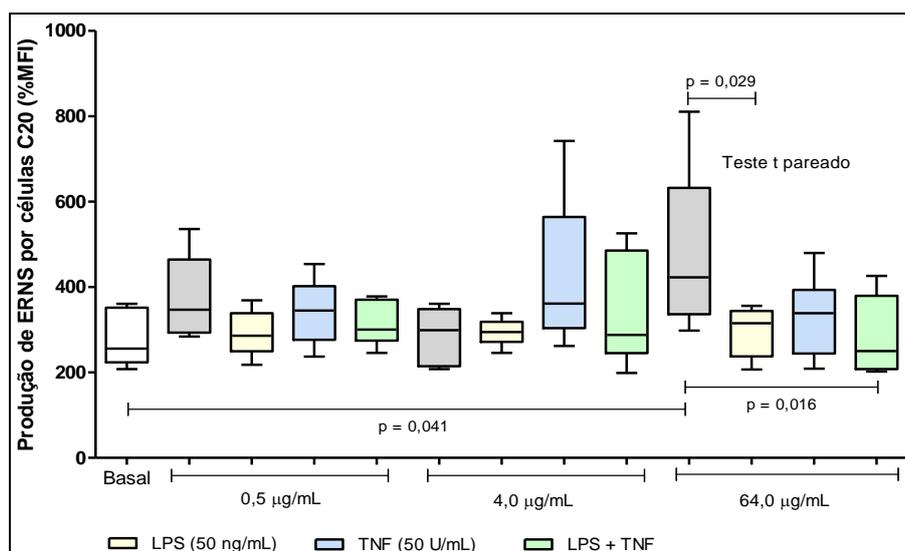


Figura 10. Produção de ERNS pelas células C20 incubadas com os diferentes estímulos. Os resultados avaliados pelo teste t pareado mostraram que a produção basal dessa espécie reativa aumenta com 64 µg/mL de epiisopilosina. No entanto, essa produção de ERNS foi inibida com a adição de 50 ng/mL de LPS ou quando se adicionou LPS (50 ng/mL) acrescido com 50 U/mL de TNF (p < 0,05). Estão mostrados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

4.6. Avaliação da produção de corpúsculos lipídicos

A figura 11 mostra a produção de corpúsculo lipídico por células C20 incubadas na presença de 3 concentrações de EPIIS (0,5, 4 ou 64 µg/mL) e na presença de LPS, TNF ou ambos os estímulos.

4.6.1. Células não estimuladas

Na ausência de estímulo (produção basal), a menor concentração de EPIIS aumentou a produção dos corpúsculos lipídicos pelas células C20, na comparação com o controle (0,0 µg/mL = 218,3 ± 103,1 %MFI; 0,5 µg/mL = 384,0 ± 137,6 %MFI) (Teste t, $p < 0,05$). As demais concentrações de EPIIS não afetaram a média±DP com 4,0 µg/mL (212,3 ± 103,1 %MFI) ou a mediana com 64,0 µg/mL (209,0 %MFI) da produção de corpúsculos lipídicos ($p > 0,05$) (Figura 11A).

4.6.2. Células estimuladas com LPS

Após estimulação com LPS, a produção de CL pelas células C20 incubadas com 64 µg/mL (173,0 %MFI) de EPIIS foi reduzida na comparação com o controle estimulado (330,0 %MFI). A produção de CL avaliada com as demais e na presença do LPS não foi afetada na comparação com o controle (0,5 µg/mL = 190,0 %MFI; 4 µg/mL = 218,5 %MFI) (Figura 11B).

4.6.3. Células estimuladas com LPS + TNF

Nenhuma das concentrações de EPIIS afetou a produção de CL pelas células C20 estimuladas com LPS e TNF associados na comparação com o controle (0,0 µg/mL = 194,5 %MFI; 0,5 µg/mL = 177,0 %MFI; 4 µg/mL = 174,5 µg/mL; 64 µg/mL = 176,5 %MFI) (Figura 11C).

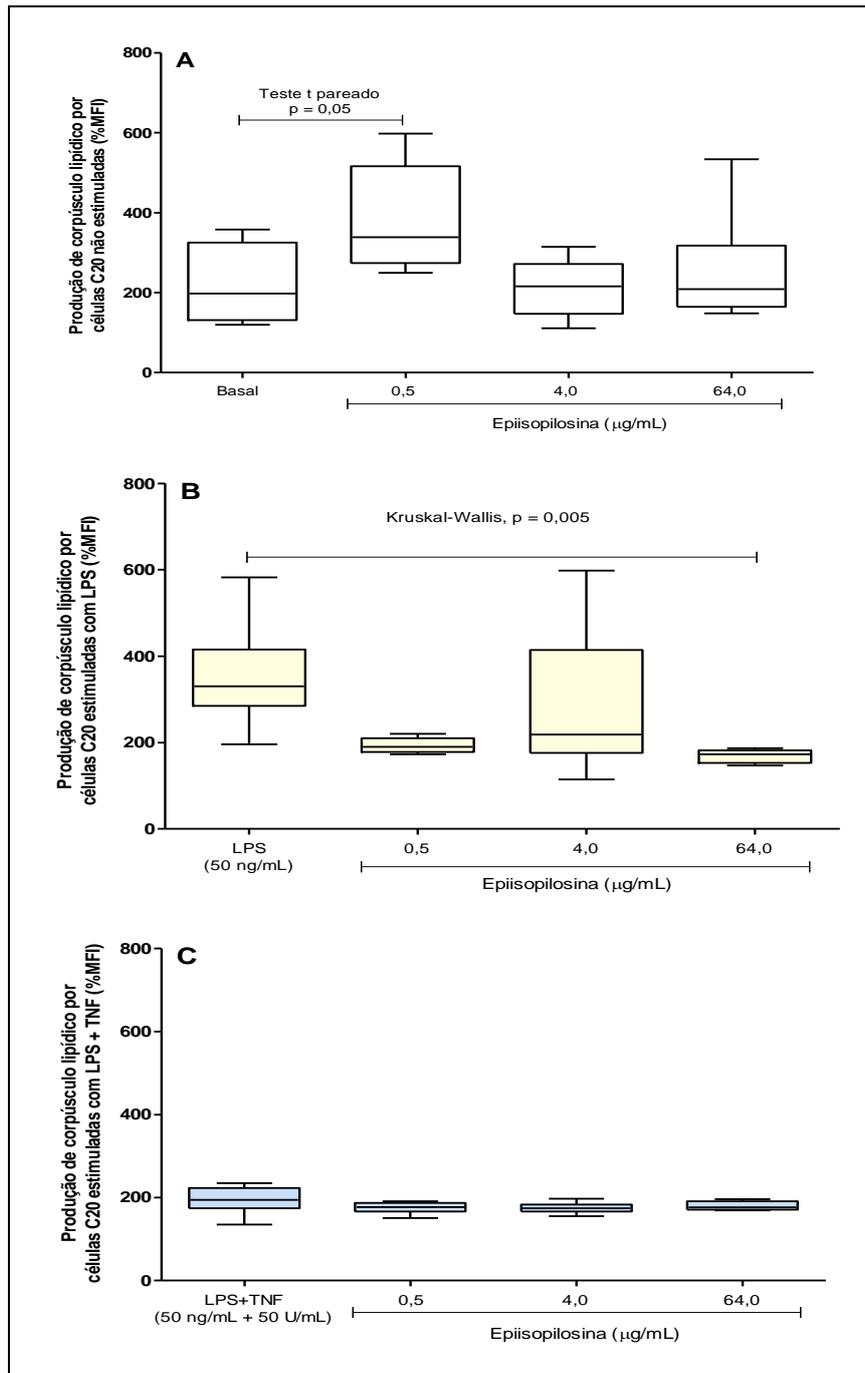


Figura 11. Produção de corpúsculos lipídicos (CL) por células C20 tratadas com as três concentrações de EPIIS (0,5, 4 e 64 $\mu\text{g/mL}$), com ou sem estímulos de LPS e TNF sozinhos ou associados. Os resultados mostraram, na comparação com o controle, que a produção basal aumentou com a menor concentração (0,5 $\mu\text{g/mL}$), mas não com as demais concentrações (4,0 e 64,0 $\mu\text{g/mL}$) (A). Na presença de LPS, a produção de CL foi menor do que o controle quando as células foram incubadas com 64 $\mu\text{g/mL}$; as demais concentrações não afetaram a produção de CL (B). Na presença de LPS+TNF, as diferentes concentrações de EPIIS não afetaram a produção de CL (C). Estão mostrados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

A figura 12 mostra a produção de ERNS pelas células C20 incubadas com os diferentes estímulos. Os resultados avaliados pelo teste t pareado mostraram que a produção basal de ERNs aumentou com 0,5 µg/mL de EPIIS, mas foi inibida com 64 µg/mL de EPIIS, retomando os níveis do controle; as três concentrações de EPIIS na presença dos estímulos (LPS, TNF ou LPS+TNF) não afetaram a produção de CL, quando comparados entre si ou com o controle ($p < 0,05$).

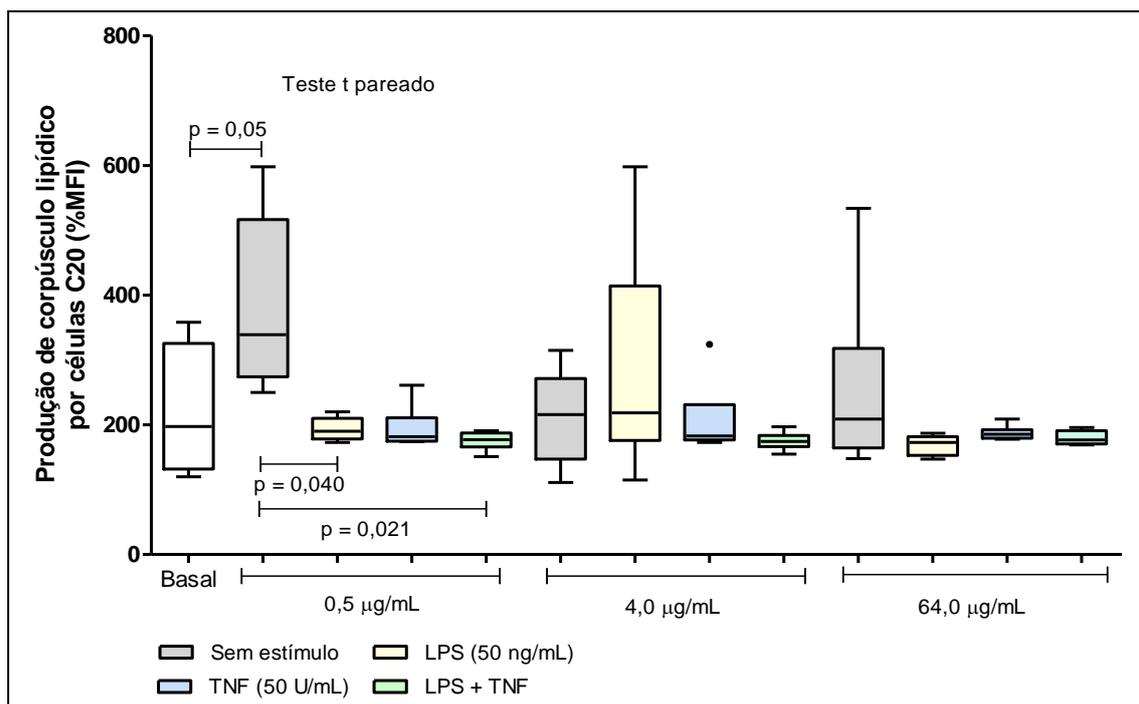


Figura 12. Produção de corpúsculos lipídicos (CL) por células C20 tratadas com as três concentrações de EPIIS (0,5, 4 e 64 µg/mL), com ou sem estímulos de LPS e TNF, isolados ou associados. Os resultados mostraram, na comparação com o controle (basal) e na ausência de estímulo, houve maior produção de CL com 0,5 µg/mL e comparado à esta concentração houve redução dos CL com 64 µg/mL (Teste t pareado; $p < 0,05$). Não houve diferenças entre os demais tratamentos ($p > 0,05$). Estão mostrados as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

4.7. Avaliação da produção de citocinas

A produção de citocinas pelas células C20 incubadas com três concentrações de EPIIS por 24 horas foi avaliada com ou sem o estímulo com LPS. Os resultados estão mostrados na tabela 1.

4.7.1. Células não estimuladas

Os resultados mostraram que a incubação das células com 0,5 µg/mL de EPIIS aumentou a produção basal de IL-17A, na comparação com o controle (Teste t, $p < 0,05$). A produção basal das citocinas IL-2, IL-6, FNT, INF, IL-4 ou IL-10 não foram afetadas pela incubação das células com as três concentrações de EPIIS ($p > 0,05$).

4.7.2. Células estimuladas com LPS

Os resultados mostraram, na comparação com o controle, redução da produção estimulada (LPS) de IL-6 com 0,5 µg/mL de EPIIS e aumento de IL-17 com 64,0 µg/mL de EPIIS (Teste t, $p < 0,05$). A produção estimulada das citocinas IL-2, FNT, INF, IL-4 ou IL-10 não foram afetadas pela incubação das células com as três concentrações de EPIIS ($p > 0,05$).

Tabela 1. Produção de citocinas por células C20 incubadas com diferentes concentrações de epiisopilosina por 24 horas.

Produção de citocinas (pg/mL)		Epiisopilosina (µg/mL)								Teste, valor de p
		Basal				Estimulado com 50 ng de LPS				
		0,0	0,5	4,0	64,0	0,0	0,5	4,0	64,0	
Inflamatórias	Interleucina - 2	8,2 ± 0,8	7,9 ± 1,5	7,6 ± 0,8	9,8 ± 23,1	8,6 ± 2,2	6,8 ± 0,9	9,4 ± 10,8	9,1 ± 3,1	ANOVA $p > 0,05$
	Interleucina - 6	50,8 ± 8,4	42,4 ± 5,5	47,7 ± 8,0	54,2 ± 5,5	64,5 ± 5,0	45,1 ± 0,6	52,7 ± 10,8	66,9 ± 3,1	ANOVA $p = 0,008$
	Interleucina - 17A	3,8 ± 1,1	4,9 ± 1,2	4,4 ± 2,1	4,7 ± 0,4	6,7 ± 1,1	4,3 ± 0,9	7,2 ± 1,8	7,5 ± 0,2	Teste t $p = 0,013$
	Fator de necrose tumoral	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	15,1 ± 26,1	12,9 ± 22,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	5,5 ± 7,2	ANOVA $p > 0,05$
	Interferon - γ	7,9 ± 0,7	8,1 ± 0,8	7,7 ± 0,6	9,2 ± 2,3	8,8 ± 2,4	7,7 ± 0,7	8,2 ± 0,4	9,0 ± 1,3	ANOVA $p > 0,05$
Anti-inflamatórias	Interleucina - 4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,5 ± 14,8	6,3 ± 10,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	ANOVA $p > 0,05$
	Interleucina - 10	7,6 ± 0,2	7,8 ± 0,1	7,5 ± 0,7	9,2 ± 2,2	8,8 ± 2,2	7,5 ± 0,5	8,7 ± 1,3	9,0 ± 0,4	ANOVA $p > 0,05$

4.8. Avaliação do tempo de incubação da epiisopilosina na função celular

Para avaliar o tempo de incubação (2 ou 24 horas) na função celular, células semi aderentes da linhagem BV2 foram incubadas com diferentes concentrações de epiisopilosina (0,5, 4,0 ou 64 µg/mL). Depois da incubação avaliou-se a capacidade fagocitária e a produção do radical superóxido.

4.8.1. Capacidade fagocitária

Os resultados mostraram que após 2 horas de incubação com 4 µg/mL do alcaloide houve, na comparação com o controle (0,0 µg/mL), aumento do índice fagocitário pelo maior percentual de células envolvidas na fagocitose. Também, na comparação com o controle (0,0 µg/mL), houve redução do índice fagocitário com as menores concentrações do alcaloide (0,5 ou 4,0 µg/mL) depois de 24 horas de incubação, sobretudo pela redução no percentual de células fagocitantes, assim como pelo menor número de leveduras ingeridas ($p < 0,05$) (Figura 13, 14; tabela 2).

Os resultados mostraram também que o tempo de incubação das células BV2 afetou a capacidade fagocitária do controle, uma vez que decorridas 24 horas, houve aumento do índice fagocitário pelo maior percentual de células fagocitantes e pela maior média de leveduras ingeridas, na comparação com 2 horas de incubação. Quanto ao efeito do alcaloide, os resultados mostraram que a maior concentração da epiisopilosina (64 µg/mL) aumentou a média de leveduras ingeridas depois de 24 horas na comparação com 2 horas de incubação (Figura 13, 14; tabela 2).

Tabela 2. Capacidade fagocitária de células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de epiisopilosina por 2 ou 24 horas.

Parâmetros da fagocitose	Epiisopilosina (µg/mL)							
	0,0		0,5		4,0		64,0	
	2h	24h	2h	24h	2h	24h	2h	24h
% células envolvidas na fagocitose	8,6±2,1*	23,1±3,7	13,4±6,5	10,5±2,6	17,5±3,0*	14,5±2,2	14,9±2,1	17,8±4,5
Média de leveduras ingeridas	0,1±0,0	0,2±0,0 ^{#@}	0,1±0,1	0,1±0,1 [#]	0,1±0,3	0,1±0,2 [@]	0,1±0,0*	0,2±0,0*
Índice fagocitário	0,8±0,4*	5,6±1,2 ^{#@}	2,4±2,0	1,2±0,6 [#]	3,2±1,1*	2,2±0,7 [@]	2,3±0,6	3,4±1,6

(*) Em cinza tem-se os pares que diferem estatisticamente (Teste t pareado, $p < 0,05$);

(* # @) Os símbolos indicam os pares com diferenças estatísticas.

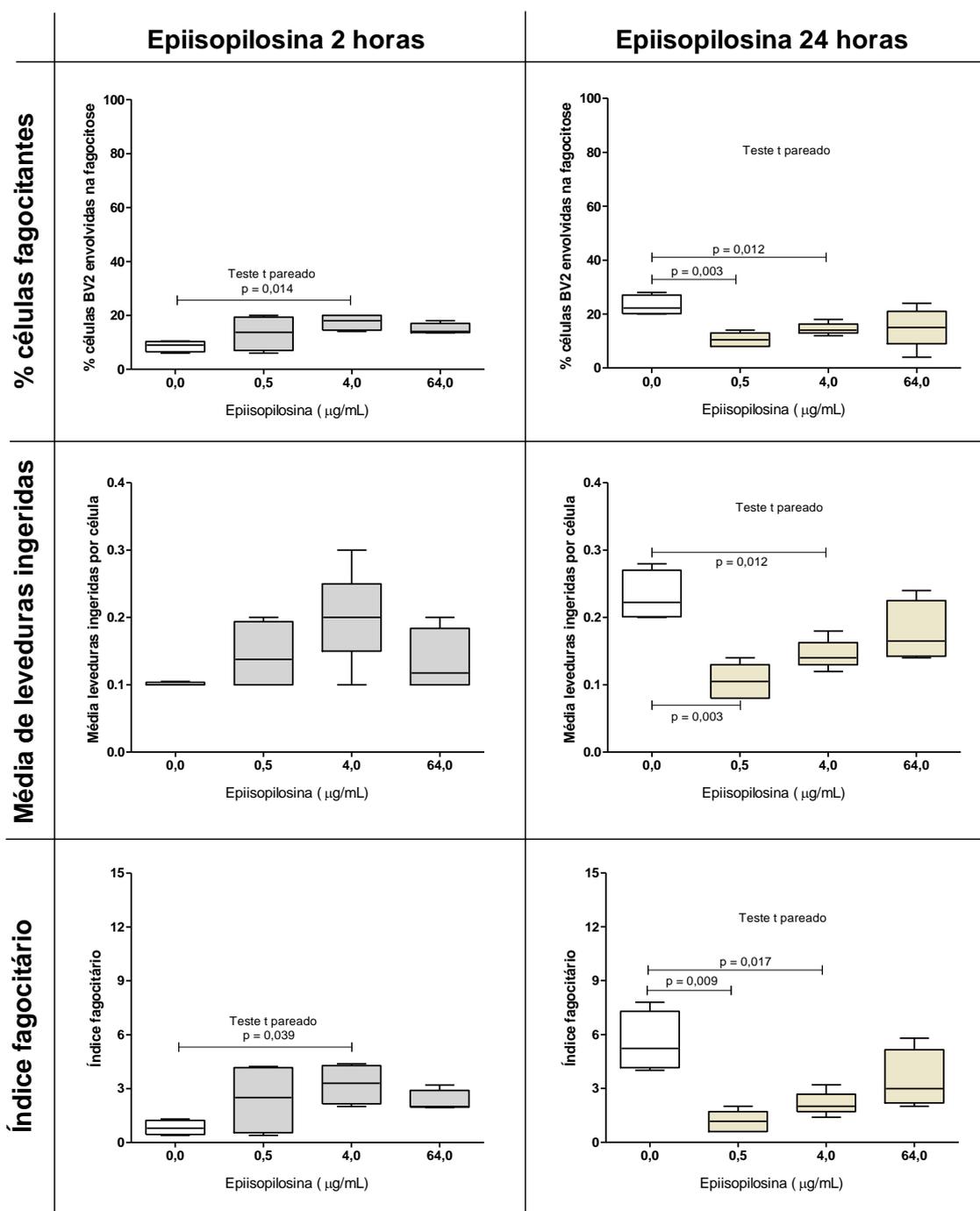


Figura 13. Capacidade fagocitária das células BV-2 incubadas com diferentes concentrações de epiisopilosina por 2 (esquerda) ou 24 (direita) horas. Os resultados mostraram que após 2 horas de incubação com 4 µg do alcaloide aumentou o índice fagocitário pelo maior % de células envolvidas na fagocitose (esquerda). Também, houve redução do índice fagocitário com as menores concentrações do alcaloide (0,5 ou 4,0 µg) depois de 24 horas de incubação, sobretudo pela redução no % de células fagocitantes, assim como pelo menor número de leveduras ingeridas ($p < 0,05$). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e os pontos extremos.

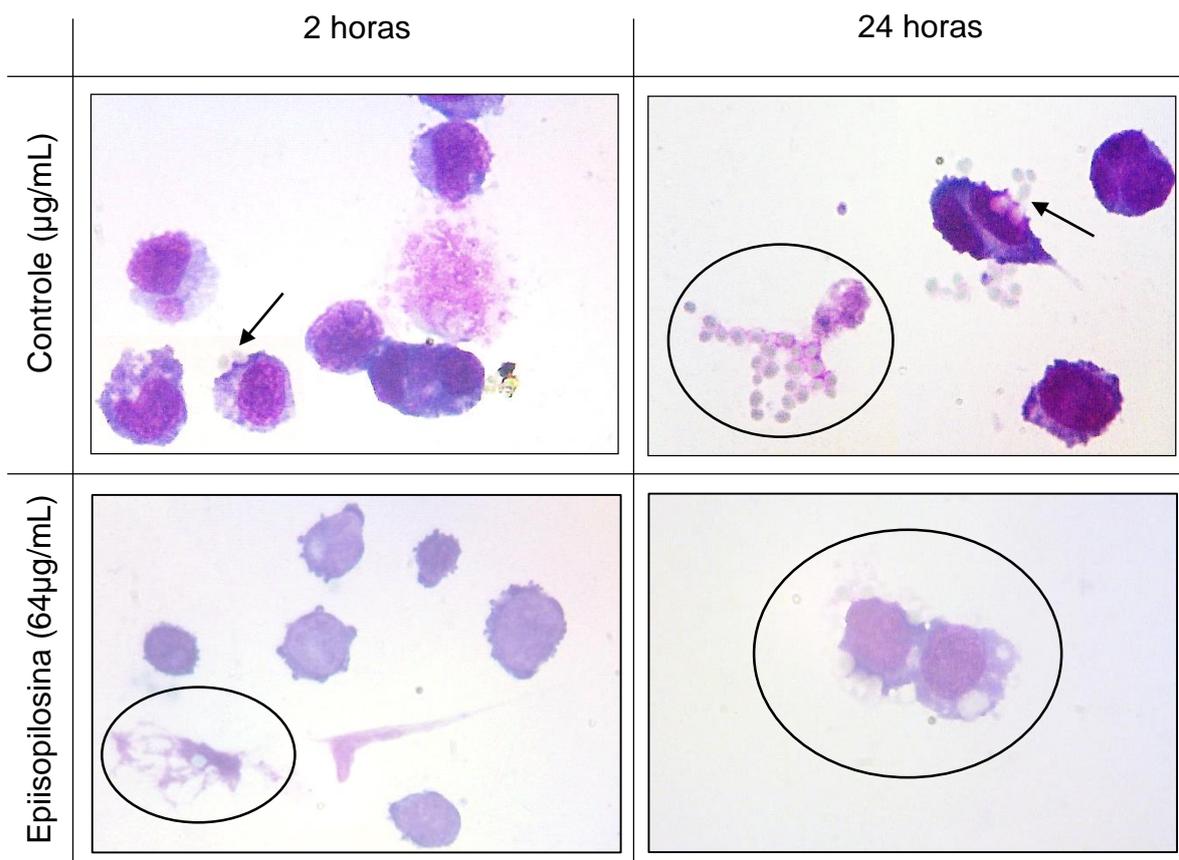


Figura 14. Fotomicrografias de células BV2 incubadas por 2 (esquerda) ou 24 (direita) horas representativas dos resultados da fagocitose obtidos para o controle (0,0 µg/mL) e para 64 µg/mL de epiisopilosina. Observar as leveduras internalizadas (círculo) ou aderidas (setas). Coloração Giemsa 10%, aumento de 1000 vezes.

4.8.2. Radical superóxido – Teste do NBT

Os resultados representados na figura 15 mostram que as três concentrações de epiisopilosina incubadas por 2 horas inibiram o percentual de células BV2 capazes de produzir o radical superóxido (O_2^\bullet), em 59% para 0,5 µg/mL ($1,4\% \pm 0,4\%$), em 48% para 4,0 µg/mL ($1,8\% \pm 0,6\%$) e em 38% para 64,0 µg/mL ($1,3\% \pm 0,5\%$), na comparação com o controle (0,0 µg/mL = $3,4\% \pm 1,3\%$) (ANOVA, $p = 0,028$).

Contrariamente, a incubação das três concentrações de epiisopilosina por 24 horas 0,5 µg/mL ($2,5\% \pm 1,2\%$), 4,0 µg/mL ($2,0\% \pm 0,4\%$) ou 64,0 µg/mL ($2,6\% \pm 0,5\%$) não afetaram o percentual de células capazes de reduzir o sal de NBT (produção do radical O_2^\bullet), quando comparadas ao controle ($3,6\% \pm 0,8\%$) (ANOVA, $p > 0,05$).

Também, os resultados mostraram que a incubação das células BV2 com 64 $\mu\text{g/mL}$ por 2 horas ($1,3\% \pm 0,6\%$) foi menor do que por 24 horas ($2,6\% \pm 0,5\%$) (Teste t pareado, $p = 0,026$).

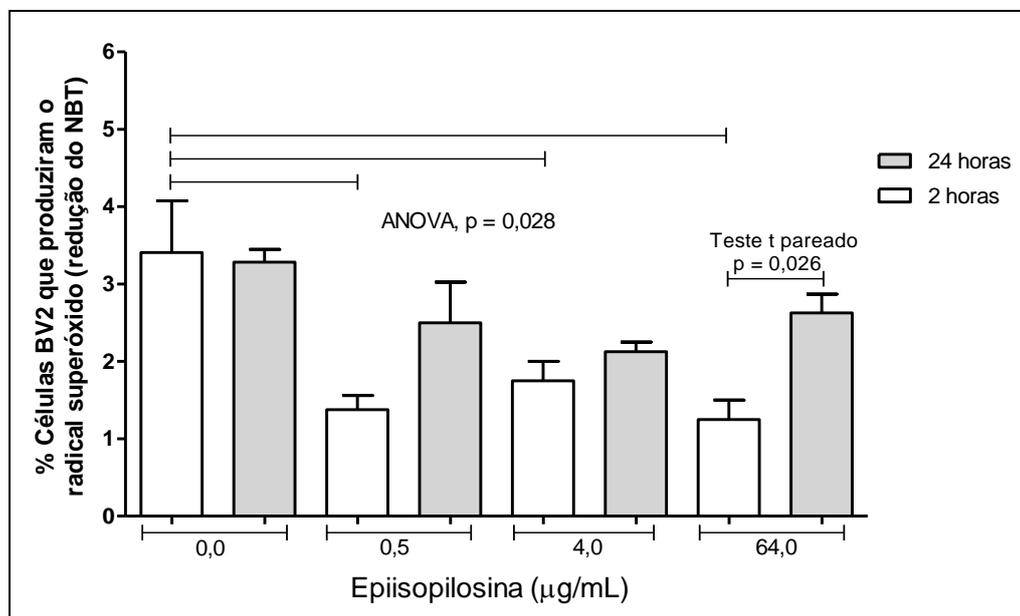


Figura 15. Percentual de células BV2 que produziram o radical superóxido (O_2°) pelo método de redução do sal de NBT. As células (6×10^4 /escavação) foram incubadas com diferentes concentrações de epiisopilosina por 2 ou 24 horas. Os resultados mostraram que as três concentrações do alcaloide reduziram o % de células que produziram o radical O_2° (ANOVA, $p = 0,028$) com 2 horas de incubação, mas não com 24 horas (ANOVA, $p > 0,05$). Também, 64 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu o % de células que produziram o radical (O_2°) com 2 horas, na comparação com 24 horas de incubação. Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

4.9. Sumários de resultados

Ensaio	Epiisopilosina (µg/mL)								
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
MTT C20	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Quimioluminescência (C20)	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓
MTT BV2 – 2 horas	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
MTT BV2 – 24 horas	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑
Aderência celular	↓			↓				↓	
Capacidade fagocitária (2 horas)	-			↑				-	
Capacidade fagocitária (24 horas)	↓			↓				↑	
NBT (2 horas)	↓			↓				↓	
NBT (24 horas)	-			-				-	
EROS S/E	↑			↑				↑	
EROs + PMA	↑			↑				↑	
ERNs S/E	-			-				↑	
ERNs + LPS	-			-				-	
ERNS + TNF	-			-				-	
ERNS +LPS + TNF	-			-				-	
CL S/E	↑			-				-	
CL LPS	-			-				↓	
CL LPS + TNF	-			-				-	
IL-2 S/E	↑			-				-	
IL-2 + LPS	-			-				-	
IL-6 S/E	-			-				-	
IL-6 + LPS	↓			-				-	
IL- 17A S/E	↑			-				-	
IL-17A + LPS	-			-				↓	
TNF S/E	-			-				-	
TNF + LPS	-			-				-	
INF- γ S/E	-			-				-	
INF- γ + LPS	-			-				-	
IL-4 S/E	-			-				-	
IL-4 + LPS	-			-				-	
IL-10 S/E	-			-				-	
IL-10 + LPS	-			-				-	

5. DISCUSSÃO

Esse estudo avaliou a função de micróglia, humana e murina, incubadas com diferentes concentrações do alcalóide epiisopilosina (EPIIS), na presença ou ausência de diferentes estímulos celulares. Considerando a função inata dos macrófagos na resposta aos agentes infecciosos e nas patologias imunológicas, a identificação de compostos que modulam a resposta imunitária torna-se um importante alvo de pesquisa. Assim, os efeitos da EPIIS observados nesse estudo para as duas linhagens de micróglia (C20 e BV2) mostraram que esse alcalóide pode ser capaz de alterar a resposta imune inata e ser um alvo para posterior aplicações biomédicas.

Como dito anteriormente, os alcaloides interagem com receptores celulares ativando ou inibindo diferentes vias celulares. É dessa interação que são observados os efeitos antimicrobianos, antiparasitários, antivirais, antiinflamatórios e imunomodulatórios reportados para as diferentes classes de alcaloides.

5.1. Considerações sobre o metabolismo mitocondrial e a produção de espécies reativas

A pesquisa básica é de extrema importância para eliminar agentes que não sejam relevantes antes que sejam aplicados recursos desnecessários. É estimado que o custo associado ao desenvolvimento de um fármaco desde os testes iniciais até a disponibilização no mercado seja de aproximadamente US\$868 milhões. O uso de culturas celulares para triar potenciais compostos terapêuticos é comum nas pesquisas pré-clínicas porque elas podem mimetizar doenças ou organismos específicos (Van et al. 2015).

Para esse estudo, inicialmente foi analisado a viabilidade celular para as células C20 e BV2 quando incubadas com as concentrações 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 µg/mL com o objetivo de avaliar se elas permaneciam viáveis ou não após a incubação e determinar as concentrações baixa, intermediária e alta do composto que seriam utilizadas nos ensaios subsequentes. Para as micróglia humanas foi realizado dois métodos diferentes, a redução do sal MTT e o teste de quimioluminescência.

As mitocôndrias são organelas presentes nas células eucarióticas responsáveis pela respiração celular e o NADPH são os carreadores de elétrons dentro dessa organela e seu produto final é o ATP (Pereira et al. 2012). A atividade

metabólica é uma forma de averiguar se as células possuem ou não viabilidade após um determinado estímulo. A redução do sal MTT possibilita essa mensuração indireta porque ele utiliza de enzimas desidrogenases mitocondriais para medir indiretamente a atividade dos nucleotídeos NADH/NADPH, seus substratos (Liu et al. 1997).

Após realização do ensaio MTT, foi observado uma redução da viabilidade celular sem dose dependência com a incubação de células C20 por 24 horas com as concentrações citadas acima quando comparadas com o controle e obtivemos CC50 na concentração 2 µg/mL da molécula com viabilidade de 55,1%. Os valores da viabilidade variaram entre 60,3% para a menor concentração testada (0,5 µg/mL) e 69,42% para a maior concentração (128 µg/mL) ($p > 0,05$). Diferindo dos estudos de Rocha (2017) que após a incubar células vero (células de rins de macaco) com 1,5, 3,12, 6,25 e 12,5 µg/mL da EPIIS por 2, 24 e 48 horas as células permaneceram com viabilidade maior que 95%.

Para avaliar a redução do MTT pelas células murinas as mesmas concentrações foram incubadas por 2 ou 24 horas. A menor concentração testada (0,5 µg/mL) resultou em um aumento significativo da viabilidade celular quando comparado ao controle em 31% ($p < 0,05$), porém as demais concentrações não apresentaram diferenças significativas nas condições testadas ($p > 0,05$). O mesmo pode ser observado nos estudos de Sousa (2023) que ao realizar o teste de viabilidade pelo ensaio de LDH (lactato desidrogenase) com células BV2 tratadas com EPI nas concentrações 1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL por 1 hora, as células permaneceram viáveis. Corroborando também com Rocha (2019), quando relatou que a viabilidade celular de neutrófilos humanos parece não alterar quando incubados por 30 minutos e/ou 1 hora.

Em contraste, quando incubadas por 24 horas em condições iguais, as células BV2 não apresentaram redução nas concentrações mais baixas, entretanto os valores foram aumentados nas concentrações mais altas do composto com percentuais de 132,2% (32 µg/mL), 116,9% (64 µg/mL), 126,5% (128 µg/mL). Sousa (2023) também obteve um resultado semelhante ao realizar o mesmo ensaio com as concentrações mais baixas da EPI sem alterações da viabilidade celular. Entretanto, as maiores concentrações pareceram afetar o metabolismo mitocondrial desse tipo celular.

Para validar o teste de MTT realizado com as células humanas foi realizado o teste de quimioluminescência. A viabilidade se mostrou distinta do teste inicial com um aumento significativo em comparação ao controle ($p < 0,0001$) desde a menor concentração (0,5 µg/mL) com 164,8% RLU até a concentração (32 µg/mL). A concentração 64 µg/mL permaneceu viável quando comparada ao controle e foi reduzida drasticamente na maior concentração da molécula (128 µg/mL).

As respostas celulares a um determinado estímulo podem variar de acordo com o ambiente (Van et al. 2015). A discrepância observada entre os estudos pode se atribuir a diversas variáveis que incluem diferentes características das células que foram utilizadas em cada estudo. Isso foi claramente demonstrado por Sá (2021) quando relatou em seus estudos *in silico*, média toxicidade para células Caco-2 (célula intestinal humana) com aproximadamente 22% de toxicidade e baixa toxicidade para células de linhagem MDCK (células renais de cachorro) com aproximadamente 9%.

Outro fator a ser considerado é a diferença nos protocolos experimentais que possuem grande importância ao decorrer da pesquisa. Entretanto, os resultados podem indicar que a EPIIS possui citotoxicidade especificamente para as células C20. Entretanto, Sá (2021) também relatou que a toxicidade aguda foi negativa para ratos e camundongos, além de alta solubilidade da molécula e consequente biodisponibilidade. Isso indica que mais testes a respeito da atividade de EPIIS em células C20 e outros tipos celulares devem ser realizados.

Um ponto importante a ser discutido é que apesar de até o momento ser desconhecida a meia vida da EPIIS ($C_{16}H_{18}O_3N_2$; peso molecular de 286,33 g/mol), a sua estrutura guarda semelhança com a da pilocarpina ($C_{11}H_{16}N_2O_2$; PM = 208,26), cuja meia vida varia entre 0,76 minutos a 1,3 hora (Hendrickson et al. 2003; DBO 2023). Considerando a similaridade entre ambas as moléculas e a baixa meia vida comuns aos alcaloides, é possível que a incubação das micróglia com a EPIIS por duas horas reflita o efeito precoce desse alcaloide, durante e depois de sua metabolização no citoplasma das células. Também, é possível que os efeitos da EPIIS observados depois de 24 horas de incubação reflitam a modificação/modulação das vias celulares sofridas pelas células, o que pode ser compreendido como um efeito prolongado, tanto do alcaloide ou mesmo de seus metabólitos.

Os estudos de Lucio (2000) mostraram o possível efeito em curto tempo da molécula através de seus resultados nos testes de toxicidade *in vivo* com a EPIIS que sugerem que a atividade geral nos camundongos reduz de forma dose dependente de 30 minutos às 2 horas de administração, provavelmente devido a degradação da molécula a benzaldeído e posterior pilosina (moléculas que são descritas como sendo farmacologicamente inativas) (Lucio et al. 2000).

Após analisar os dados e a possível atividade biológica foram definidas três concentrações, baixa (0,5 µg/mL), intermediária (64 µg/mL) e alta (128 µg/mL) para os ensaios funcionais.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas que contém em sua conformação um ou mais átomos de oxigênio e podem se apresentar como radicais livres reativos (como no caso dos radicais hidroxilia ($\bullet\text{OH}$), radicais peroxil ($\bullet\text{OOH}$), alcoxil ($\bullet\text{OOR}$) e ânion superóxido ($\text{O}_2 \bullet^-$)) ou como não radicais (oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), ozônio (O_3) e o ânion hipoclorito (OCl^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)). Essas moléculas são produzidas nos processos oxidativos da metabolização das células em resposta uma sinalização e o aumento delas pode estar relacionado a danos celulares de estresse oxidativo (Herb & Schramm 2021; Chen & Butow 2005).

As enzimas NADPH oxidases (Nox), proteínas de membrana, levam NADPH para o O_2 gerando o ânion superóxido que na matriz mitocondrial é dismutado e transformado em H_2O_2 . Essa produção é importante na sinalização imunológica e ocorre nos macrófagos após a fagocitose com o objetivo de destruir um determinado agente estranho em seus fagossomas. Essas espécies reativas (ER) interagem com moléculas celulares e, em excesso, podem causar a peroxidação de lipídeos, oxidar proteínas, inativar enzimas e ativar vias celulares pró-inflamatórias como na produção de FNT, interleucinas e $\text{TGF-}\beta$ (Herb & Schramm 2021; Ferrari et al. 2009).

A geração de espécies reativas é sobretudo um importante mecanismo imunitário inato dos macrófagos para a eliminação de agentes infecciosos, mas quando produzidos em excesso, são capazes de provocar danos teciduais como por exemplo os observados nas imunopatogênias (alergias, psoríase, eczemas, etc); a produção excessiva de EROS danifica as proteínas/enzimas mitocondriais,

as membranas e o DNA, interrompendo a produção de ATP e outras funções essenciais nas mitocôndrias (Murphy 2009).

Ainda sobre a produção de ER, as células possuem mecanismos para inativar seus efeitos oxidativos danosos. Assim, as células utilizam enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione redutase (GR) e a glutathione peroxidase (GPx); outras substâncias não enzimáticas como a vitamina E e C, glutathione, vários carotenóides e flavonóides são importantes na inativação das ERs (Beckman & Ames 1999). Em condições normais, a produção excessiva de ERs é limitada pelos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos como forma de proteger as mitocôndrias e garantir a produção de ATP.

Considerando o papel dos macrófagos na imunidade inata e na geração de espécies reativas durante o metabolismo mitocondrial, EROS foi quantificado nas células C20 estimuladas ou não com a molécula PMA, e incubadas por 24 horas com as dosagens baixa, intermediária e alta da EPIIS. Nas condições experimentais apresentadas, as concentrações 0,5, 4 ou 64 µg/mL aumentaram significativamente os valores de EROs em nossa quantificação tanto na presença, como na ausência de estímulo com um maior aumento observado na concentração mais alta (128 µg/mL) com 270,6% MFI (sem estímulo) e 276,6% MFI (com estímulo) indicando uma possível dose dependência. Esse efeito observado reflete o potencial possível imunomodulador de EPIIS.

Rocha (2019) descreveu em seus estudos que após incubar neutrófilos humanos nas concentrações 10, 25, 50 e 100 µg/mL da EPIIS em neutrófilos humanos, obteve uma redução significativa na produção de EROs de 73,2 % (controle) para 37,6 % após 15 minutos de incubação o mesmo foi observado para EPI com redução de 33,4%. Nesse contexto, acredita-se que o tratamento no menor tempo (2 horas) das células com concentrações até 64 µg/mL de EPIIS pode favorecer a eliminação de agentes infecciosos *in vivo*, no entanto considera-se que tratamentos prolongados (24 horas) com esse alcalóide pode favorecer o desenvolvimento de imunopatogênias. Diante disso, a imunodulação pela administração de uma substância exógena pode ser alvo terapêutico importante.

Os resultados mostrados acima para a produção de ERs pelas micróglia C20 refletiram o efeito da EPIIS quantificado depois de 24 (efeito prolongado). No

entanto, para avaliar o efeito da EPIIS depois de curto (2 horas) de incubação ou longo tempo de incubação (24 horas) avaliou-se a atividade mitocondrial pela quantificação do percentual de micróglias BV2 que expressaram o radical superóxido (O_2°) por método morfológico. Assim, os resultados mostraram que as três concentrações do alcalóide reduziram o percentual de células que produziram o radical O_2° com 2 horas de incubação, mas não com 24 horas. Também, 64 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu o percentual de células que produziram o radical (O_2°) com 2 horas, na comparação com 24 horas de incubação, o que chama a atenção para o efeito da EPIIS, especialmente nessa última concentração.

Os efeitos observados com o menor tempo de incubação (2 h) indicaram que as três concentrações de EPIIS foram capazes de afetar a atividade mitocondrial das células BV2 gerando o O_2° , enquanto que a ausência desse efeito observada com 24 horas pode indicar que as três concentrações de EPIIS sofreram metabolização pelas células. Em estudos futuros sugere-se avaliar a curva dose-resposta em função do tempo até 24 horas para estimar o tempo de atividade do alcalóide.

As ERNs compõem um grupo de compostos químicos que também um grupo importante na imunidade inata, são gerados quando L-arginina é convertido em L-citrulina na presença de O_2 através das sintases de óxido nítrico (iNOS). ERNs e EROs possuem interação quando NO reage com o superóxido para gerar peroxinitrito ($ONOO^-$) (Al-Shehri. 2021; Bogdan 2015). O óxido nítrico (NO) é uma molécula importante que pode atuar de forma parácrina e/ou autócrina produzida por diferentes células do organismo. Nos macrófagos, em condições fisiológicas normais, possui efeito protetor contra agentes infecciosos, mas em doses elevadas é extremamente citotóxico (Chatuverdi & Nagar 2009).

Ao quantificar ERNs notou-se que a exposição das micróglias humanas por 24 horas com a EPIIS afetou a produção de ERNs apenas na ausência dos estímulos TNF e LPS na concentração 64 $\mu\text{g/mL}$ (423 % MFI). Na presença dos estímulos inflamatórios molécula não alterou a quantificação. O estudo de Sousa (2023) mostra que a EPI foi capaz de reduzir a produção de NO em células BV2 estimuladas com LPS, bem como a expressão da iNOS. A regulação da expressão gênica que produz a enzima iNOS é realizada pela via MAPK e NF- κ B.

O estímulo LPS pode estimular TLR4 presente nas membranas de macrófagos, ativar essa via e aumentar a expressão de genes e conseqüentemente após o estresse, aumentar essa produção (Kashfi et al. 2021). Devido a semelhança de EPIIS e EPI, esses dados sugerem que nas condições experimentais testadas, a EPIIS poderia estar atuando como imunomodulador das vias intracelulares NFκ-B e MAPK na concentração mais alta citada, no entanto é necessário outros ensaios para melhor elucidar esse efeito.

5.2. Considerações sobre a produção de corpúsculos lipídicos e citocinas

Os corpúsculos lipídicos (CL) são organelas responsáveis pelo armazenamento montagem e fornecimento intracelular de lipídios em células eucarióticas, alguns patógenos tem essa organela como alvo, porque o conteúdo dela pode servir de substratos para eles. Quando essas células sofrem algum tipo de estresse passam a produzir mais corpúsculos lipídicos, refletindo um papel importante dessas organelas na imunidade inata (Bosch et al. 2020).

Essas organelas podem funcionar como sinalizadores de inflamação (Pacheco et al. 2002) e para elucidar o possível efeito da EPIIS sobre a imunidade inata de macrófagos, foi realizado a quantificação de corpúsculos lipídicos. Na ausência dos estímulos LPS e/ou TNF a produção de CL foi alterada na concentração mais baixa da molécula, houve um aumento significativo ($p < 0,05$). Por outro lado, após o estresse da estimulação com LPS na concentração 64 µg/mL houve redução dessas organelas em comparação com seu controle estimulado, indicando um possível efeito anti-inflamatório nessa concentração. As demais concentrações não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$).

O CL é composto pelos lipídios triacilglicerol, ésteres de colestérol e diacilglicerol envolto por uma membrana complexa de fosfolípido e regulam a atividade de enzimas importantes para a imunidade inata como a PI3 quinase, MAP quinase e PKC quinase. Diferente das células comuns, as células da imunidade inata quase não expressam CL em condições de repouso, o aumento de CL nessas células é relacionado a infecções ou condições inflamatórias (D'Avila et al 2008).

A formação de corpúsculo lipídico em macrófagos induzidas por LPS ocorre principalmente dependente do receptor TLR-4 (D'Avila et al. 2008; Pacheco et al. 2002). Os TLRs são receptores expressos na membrana de células do sistema

imune inato, são estimulados por estruturas expressas em diferentes agentes patológicos como bactérias, vírus e parasitos. Essas estruturas denominadas PAMPs ativam esses receptores que conseqüentemente ativam suas vias inflamatórias gerando uma determinada resposta (Akira et al. 2006). Ao utilizar a estimulação de LPS em camundongo C3H/HeJ, que possui uma resposta defeituosa ao LPS, Poltorak (1998) demonstrou em seus estudos que o TLR4 é um sensor importante para o LPS, pois nessas condições a via não era significativamente ativada. Os resultados obtidos pela quantificação do CL, sugerem mais uma vez, que a EPIIS pode estar interagindo com esse receptor.

O reconhecimento do estímulo LPS ocorre de maneira variada, que se inicia com a interação dessa estrutura a proteínas receptoras como a proteína de ligação a LPS (LBP), CD14, MD-2 que reconhecem o LPS e ativam o receptor TLR4. Esse por sua vez, sofre oligomerização e recruta proteínas adaptadoras dependentes ou não de Myd88 (Lu et al. 2008). O MyD88 ativa a enzima quinase IRAK, uma família de enzimas importantes para a indução de citocinas pró-inflamatórias, que se liga a TRAF-6 formando um complexo UBC13 (enzima conjugadora de ubiquitina 13 e UEV1A (enzima conjugadora de ubiquitina E2 variante 1 isoforma A), ativando a enzima TAK1 (quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β) que então ativa as vias IKK (I κ B quinase) e MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). Um complexo de IKK então degrada a I κ B e ocorre a translocação do NF- κ B para o núcleo celular. Processo esse que induzirá a resposta inflamatória de CL e citocinas (Lu et al. 2008).

A proteína adaptadora TRIF atua na ativação da via IRF3 mas também é capaz de ativar a NF- κ B e MAPK (em fase tardia) não dependente de myd88. TRIF recruta TRAF3 que se liga a TANK (ativador NF- κ B associado a um membro da família TRAF), TBK1 (quinase de ligação a TANK 1) e IKK, assim estimula a translocação IRF3 para o núcleo da célula (Lu et al. 2008). Após a ativação da via inflamatória, ocorre a transcrição do gene alvo a depender do estímulo recebido que levam a produção de mediadores inflamatórios (Lu et al. 2008).

As citocinas são uma rede de moléculas glicoproteicas mediadoras inflamatórias responsáveis pela comunicação do sistema imune nos processos de diferenciação celular, proliferação e resposta a lesões e infecção. Possuem tamanho que varia de 8 a 30 kDa e sua função é exercida tanto de forma parácrina

como autócrina. Sua formação ocorre em cascata, onde uma citocina se liga em receptores específicos estimulando sua célula alvo a produzir mais citocinas através de transcrição gênica (Oliveira et al. 2011).

O NFkB fica inativo dentro da célula por um inibidor natural I κ B e pode ser ativado pela via canônica ou não canônica. A mais estudada é a via canônica, que pode ser mediada por diversos receptores como por exemplo os receptores *Toll-like* (TLRs) e moléculas pró-inflamatórias como por exemplo o LPS. O LPS pode induzir a expressão de COX-2 e ativar essa via de inflamação (Mitchell & Hoffmann 2016). Por essa razão utilizamos LPS como estímulo com o objetivo de induzir o processo inflamatório para verificar a função celular através da produção de citocinas pelas células C20 incubadas por 24 horas com EPIIS. Em resumo, a incubação com o composto resultou em uma redução na quantificação de IL-6 quando as células foram estimuladas. Corroborando com Rocha (2019) que apresentou em seus estudos a inibição em 81,7 % da produção de IL-6 após incubação por 1 hora com 50 μ g/mL de EPIIS, o mesmo ocorreu para a episopiloturina com inibição e de 77,4%. Essa diminuição também foi relatada quando incubados com EPII nos estudos de Sousa (2023).

A IL 6 é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por macrófagos é uma interleucina pró inflamatória, responsável pela diferenciação mieloide, ativação de NK e influencia na resposta adaptativa quando participa da diferenciação de Linfócitos T (Rossol et al. 2011). Apesar de haver controvérsias a respeito da produção de IL-17 pelos macrófagos, devido sua produção ser exercida principalmente por células TCD4+, após estímulos específicos essa citocina pode ser produzida por neutrófilos, células NK, micróglia e macrófagos tumorais (McGeachy et al. 2019; Zhu et al. 2008). As células C20 quando estimuladas produzem IL-17 e IL-6 (Garcia-Mesa et al. 2017). A produção de IL17 também foi alterada, na ausência do estímulo LPS é possível observar um aumento dessa interleucina. No entanto, nas células estimuladas é possível observar que na concentração 64 μ g/mL houve uma redução significativa dessa interleucina em comparação a produção basal estimulada ($p < 0,05$). Por outro lado, a EPIIS não demonstrou capacidade de alterar a produção das demais citocinas quantificadas.

A ativação das vias NF-kB e MAPK nos macrófagos decorrentes do contato com LPS, ativa uma cascata de moléculas pró-inflamatórias que resultam em

transcrição de genes que levam a produção de citocinas como a IL-6 e IL-17. Essas vias são ativadas pelo TLR4 (Liu et al. 2017). Após o macrófago secretar IL-6 e IL-17 essas moléculas podem atuar hiperativando e promovendo a diferenciação específica de células T CD4+ virgens e estimular essas células a produzirem outras citocinas (Tanaka et al. 2014; Rossol et al. 2011).

Ambas as citocinas citadas são citocinas pró inflamatórias que podem ser produzidas após a ativação da via NF-kB, e seus respectivos aumentos estão relacionados a processos inflamatórios graves (Amatya et al. 2017; Schmidt-Arras & Rose-John 2016). Assim os dados sugerem que EPIIS pode estar atuando nesse receptor bem como, funcionar como um agente imunomodulador anti-inflamatório através da inibição da hiperativação dessa via.

5.3. Considerações sobre a expressão de receptores de aderência celular

As moléculas de adesão celular são estruturas presentes na superfície celular responsáveis pela comunicação célula-célula e seu ambiente extracelular. Essa interação ocorre através do reconhecimento de domínios dessas estruturas, tem um papel importante na regulação do sistema imune e são fundamentais para o desenvolvimento da resposta que será envolvida durante uma inflamação. Quando rompido esse mecanismo, pode levar a uma série de complicações decorridas da perda da homeostase, como perca sensorial, distúrbios imunitários, reprodutivos e metástase tumoral (Samanta 2015).

Essas moléculas estão subdivididas em 4 grupos: Integrinas, selectinas superfamília de imunoglobulinas e caderinas. As integrinas são proteínas transmembranas que se ligam em componentes de matriz extracelular como colágenos, proteínas, fibronectinas e as selectinas fornecem o reconhecimento de moléculas apresentadas na superfície celular, como por exemplo os carboidratos. As imunoglobulinas e caderinas se ligam a proteínas de sua família e estão envolvidas na junção neuronal e epitelial em indivíduos humanos (Samanta 2015).

As moléculas de adesão intercelular do tipo 1 são as principais estudadas devido fundamentais para uma resposta imune satisfatória e moléculas que inibam esse processo podem ser fundamentais para desenvolvimento de agentes terapêuticos anti-inflamatórios. Alguns estudos tem mantido o foco em moléculas naturais que podem apresentar esse comportamento para tal (Samanta 2015).

Em uma resposta a patógenos, por exemplo, as células do meio são ativadas por estímulos extracelulares e passam a expressar CAMs que interagem com as células do sistema imune afim de facilitar a resposta a chegada das células imunitárias no local de inflamação, tornando essas moléculas importante foco de inibição para evitar distúrbios inflamatórios exacerbados (Samanta 2015).

Para melhor compreensão da perda da viabilidade celular vista no primeiro teste verificamos como o alcaloide atuava acerca da aderência celular das células C20. A incubação com a EPIIS por 24 horas diminuiu significativamente a aderência dessas células ($p < 0,05$). Esses resultados foram confirmados por Guimarães (2018), o autor descreve em seus dados em tempo real, após o tratamento das células NIH-3T3 e HaCat com diferentes concentrações de EPIIS, houve uma redução significativa em suas respectivas aderências na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ mas não em 512 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo pode ter ocorrido com as células C20.

5.4. Considerações a capacidade fagocitária

A fagocitose é um processo complexo de ingestão e eliminação de partículas com mais de 0,5 μm de diâmetro, incluindo microrganismos, substâncias estranhas e células apoptóticas (Levin et al. 2016). Diferentes células são capazes de realizar a fagocitose. Fibroblastos, células epiteliais e endoteliais também atuam como fagócitos não-profissionais na manutenção da homeostasia dos tecidos relacionados pela fagocitose com baixa eficiência de células mortas. Ao contrário dessas, os fagócitos profissionais (macrófagos, monócitos, osteoclastos e células dendríticas) constituem um grupo especializado de células responsáveis pela eliminação de micro-organismos, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos. No processo de fagocitose as células, inicialmente, detectam a partícula a ser ingerida pelos receptores de superfície e na sequência a internalizam por movimentação do citoesqueleto/pseudópodos formando assim, o fagossoma que depois de fusionado ao lisossoma forma o fagolisossoma (Canton 2014; Levin et al. 2016).

Os receptores de superfície dos fagócitos reconhecem de forma inespecífica as partículas/células a serem fagocitadas. Esses, dividem-se em não opsônicos que identificam os padrões moleculares associados (C-tipo lectinas,

delectina-1 e 2, mincle, DC-Sign, CD33, scavenger) que, em colaboração com os receptores semelhantes ao Toll (TLRs) otimizam o processo de fagocitose por esses receptores (Dambuza & Brown 2015; Canton et al. 2013; Kawai & Akira 2011; Iwasaki & Medzhitov 2015). Os receptores opsônicos reconhecem proteínas conhecidas como opsoninas presentes na superfície das partículas/células, dentre as quais incluem-se os anticorpos (receptores Fc, fibronectina, receptores do complemento (C3b), globulina da gordura do leite (lactaderina) e lectina de ligação à manose (Flannagan et al. 2012).

Nesse estudo, o processo de fagocitose foi avaliado nas células BV2 (micróglia) pela incubação dessas com leveduras mortas na presença de diferentes concentrações de EPIIS por 2 ou 24 horas. Para avaliar a fagocitose pelos receptores para os padrões moleculares, as leveduras foram previamente incubadas com soro fetal bovino para recobri-las com as proteínas inativadas que, durante o processo de fagocitose, foram reconhecidas com os receptores não opsônicos das micróglia.

Os resultados da avaliação da capacidade fagocitária (Índice fagocitário = % células fagocitantes x média de leveduras ingeridas) mostraram que a EPIIS afetou as micróglia BV2. Especificamente, quando comparado ao controle, 4 µg/mL do alcalóide aumentou o IF por aumentar o percentual de micróglia envolvidas na fagocitose avaliada por 2 horas. No entanto, depois de 24 horas, as duas menores concentrações (0,5 e 4 µg/mL) inibiram o IF por diminuir tanto a média de leveduras ingeridas quanto o % de células fagocitantes. Diante disso, é possível supor que, depois de 2 horas, a concentração intermediária da EPIIS (4 µg/mL) ativou as vias celulares das micróglia relacionadas à formação dos pseudópodes e que, depois de 24 horas, as duas menores concentrações (0,5 e 4 µg/mL) inibiram a formação dos pseudópodes e a expressão dos receptores não opsônicos.

Esses resultados mostraram que a maior concentração da EPIIS (64 µg/mL) não foi efetiva na modulação da capacidade fagocitária das células BV2, ao passo que 4 µg/mL foi capaz de modular positivamente a fagocitose com 2 horas e negativamente com 0,5 ou 4 µg/mL decorridas 24 horas.

5.5. Considerações finais

As DTNs constituem um problema mundial de saúde e a emergência e reemergência de doenças infecciosas, resistência a medicamentos existentes além dos efeitos colaterais apresentados ao uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais levam a necessidade de prospecção de moléculas que possuam efeitos farmacológicos que sejam naturais, eficazes e sem toxicidade. A utilização de metabólitos de plantas tem sido amplamente descrita com atividades bioativas (Mackey et al. 2014; Mendes et al. 2012; Catanzaro et al. 2018)

Os macrófagos são as principais células da imunidade inata que possuem nomenclaturas diferentes a depender de seu tecido local de atuação, as micróglias por exemplo, atuam no SNC e são as principais células de defesa do tecido. Modelos de macrófagos/micróglias imortalizados são ótimos para pesquisas pré-clínicas envolvendo a investigação de atividade biológica de compostos pois eles podem mimetizar doenças e atividades inflamatórias de um organismo vivo (Cruvinel et al. 2010; Garcia-Mesa et. 2017; Van et al. 2015).

Os alcaloides são capazes de interagir com moléculas receptoras e proteínas celulares e a epiisopilosina, apesar de pouco explorada, é um forte candidato para estudos que visem investigar sua bioatividade como imunomodulador, principalmente quanto a suas características anti-inflamatórias e ausência de toxicidade *in vivo* (Debnath et al. 2018; Rocha et al. 2017; Guimaraes et al. 2018; Rocha et al. 2019). Para isso foi realizado ensaios para verificar as alterações que as incubações de micróglias imortalizadas com diferentes concentrações da EPIIS poderiam ocasionar em suas funções como macrófagos da imunidade inata.

Esse estudo mostrou que a EPIIS possui atividade em células C20 e BV2, possivelmente por interagir com o receptor TLR4, inibindo ou reduzindo a atividade de vias inflamatórias. No entanto, sugere-se a continuidade dos estudos para avaliar o mecanismo de ação desse metabólito nas vias celulares dos macrófagos.

6. CONCLUSÃO

Na comparação com o controle (0,0 µg/mL), os resultados permitiram as seguintes conclusões para a EPIIS:

- as diferentes concentrações (0,5 a 128 µg/mL) não afetaram o metabolismo mitocondrial das células C-20 quando incubadas por 24 h (teste do MTT);
- a quimioluminescência mostrou que 1 ou 4 a 32 µg/mL aumentou a atividade mitocondrial/viabilidade das células C-20, mas reduziu com 128 µg/mL;
- a incubação das células BV-2 com 0,5 µg/mL/2h ou com 32, 64 ou 128 µg/mL por 24 h aumentaram o % de células viáveis (teste do MTT), mas as demais concentrações não afetaram o metabolismo mitocondrial das células (2 ou 24 h);
- houve redução no % de células C-20 aderidas pela incubação por 24 h com 4,0 ou 64,0 µg/mL;
- a maior concentração (64,0 µg/mL) aumentou a produção estimulada ou basal de EROS e a produção basal de ERNS pelas células C-20;
- a produção estimulada de ERNS (LPS ou LPS + TNF) foi inibida pelas células C-20 com 64,0 µg/mL;
- a produção basal de CL foi maior nas células C-20 com 0,5 µg/mL, mas a estimulada (LPS) foi inibida com 64,0 µg/mL;
- a menor concentração (0,5 µg/mL) aumentou a produção basal de IL-17A das células C20 e com 4,0 ou 64,0 µg/mL estimuladas com LPS;
- as três concentrações de EPIIS não afetaram a produção basal das citocinas IL-2, IL-6, FNT, INF, IL-4 ou IL-10 nas células C-20;
- 4 µg/mL/2h aumentou o IF das células BV-2 pelo maior % de células fagocitantes (%cel), enquanto que 0,5 ou 4,0 µg/mL por 24 h reduziu o IF pela menor %cels e pelo menor nº de leveduras ingeridas (Mlev).

Quanto ao tempo de incubação (2 ou 24 horas) das células BV-2 com ou sem as diferentes concentrações da EPIIS os resultados mostraram que:

- houve redução na produção do radical O_2° nas três concentrações com 2 h, mas não com 24 h;
- comparado com 2 h, houve aumento na Mlev com 64 µg/mL/24 h;

- o IF foi maior com 24 h no controle, do que com 2 h, pelo maior %cél e pela Mlev;
- comparado com 2 h, a produção do radical O_2^\bullet foi maior com 64 $\mu\text{g/mL}/24$ h.

O conjunto dos ensaios funcionais demonstraram que as três concentrações de EPIIS afetaram a atividade mitocondrial das micróglia, a expressão de receptores de aderência, a produção de EROS e ERNS, a produção de corpúsculos lipídicos/citocinas e a capacidade fagocitária, evidenciando o potencial das da EPIIS em modular a resposta imunitária inata das micróglia, assim, sugere-se a continuidade dos estudos visando a futuras aplicações biomédicas in vivo.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Embora as células de linhagem forneçam informações relevantes para pesquisas iniciais, elas são geneticamente modificadas e não fornecem representação fiel de um organismo vivo que envolvem muitos outros sistemas, variações genéticas fatores ambientais, apenas nos dá orientações e norte para futuras aplicações e reprodutibilidade. As células C20 em especial, possuem crescimento demorado, por serem células grandes e existir a dificuldade em alcançar o número ideal para os ensaios, o que tornou o trabalho com esse tipo celular limitado.

A epiisopilosina é uma molécula relativamente nova e pouco se sabe sobre seus efeitos bioativos na resposta imune, seus mecanismos de atuação, além disso, seus efeitos nas células ainda são pouco elucidados.

Dada a infinidade de proteínas e vias celulares relacionadas à imunidade inata, a limitação do tempo e custo, assim como as limitações impostas pela pandemia de COVID-19, o estudo ficou limitado aos resultados apresentados.

Apesar do exposto, o presente estudo forneceu dados interessantes que podem ser reproduzidos e somados aos achados publicados para aumentar os conhecimentos sobre o composto e abrir espaço para explorar suas atividades farmacológicas.

Como perspectivas advindas desse estudo propõe-se então:

- Repetir os ensaios com diferentes células do sistema imunitário inato (cultivos primários e imortalizados) incubadas com a EPIIS por 2, 6 12 e 24 horas;
- Quantificar e identificar proteínas de membrana após expressas após a incubação com o composto;
- Avaliar o efeito da EPIIS em diferentes patógenos, afim de detectar seus efeitos antiparasitários;
- Avaliar o efeito da EPIIS em macrófagos infectados com organismos patogênicos para explorar melhor suas vias de sinalização e efeito imunomodulador;
- Realizar ensaios de biodisponibilidade *in vivo* para identificar a metabolização da EPIIS, sua meia-vida e vias de excreção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
2. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol*. 2017;38(5):310-22.
3. Araújo-Vilges KM, Oliveira SV, Couto SCP, Fokoue HH, Romero GAS, Kato MJ, et al. Effect of pipartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. *Pharm Biol*. 2017;55(1):1601-7.
4. Aromdee C, Ferguson MM, Ledger R, Wall J. A pilot study of the disposition of pilocarpine in plasma, saliva and urine after a single oral dose. *Eur J Pharm Sci*. 1999;8(2):81-3.
5. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, et al. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:488.
6. Batlouni M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e reais. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(4): 556-63.
7. Beckman KB, Ames BN. Endogenous oxidative damage of mtDNA, *Mutat. Res*. 424 (1999) 51–58.
8. Behl T, Kumar K, Brisc C, Rus M, Nistor-Cseppento DC, Bustea C, et al. Exploring the multifocal role of phytochemicals as immunomodulators. *Biomed Pharmacother*. 2021;133:110959.
9. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*. 2004;40(12):845-59.
10. Bezerra DP, Militão GC, de Castro FO, Pessoa C, de Moraes MO, Silveira ER, et al. Pipartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol In Vitro*. 2007;21(1):1-8.
11. Bhambhani S, Kondhare KR, Giri AP. Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules*. 2021;26(11).
12. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*. 1990;27(2-3):229-37.
13. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol*. 2015;36(3):161-78.

14. Bosch M, Sánchez-Álvarez M, Fajardo A, Kapetanovic R, Steiner B, Dutra F, et al. Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense. *Science*. 2020;370(6514).
15. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*. 13:621–34, 2013. doi:10.1038/nri3515
16. Canton J. Phagosome maturation in polarized macrophages. *J Leukoc Biol*. 96:729–38, 2014. doi:10.1189/jlb.1MR0114-021R
17. Carvalho LR, Brito TV, Simião CJJ, Dias JJG, Magalhães AD, Sousa SG, et al. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;102:278-85.
18. Casciaro B, Mangiardi L, Cappiello F, Romeo I, Loffredo MR, Iazzetti A, et al. Naturally-Occurring Alkaloids of Plant Origin as Potential Antimicrobials against Antibiotic-Resistant Infections. *Molecules*. 2020;25(16).
19. Catanzaro M, Corsini E, Rosini M, Racchi M, Lanni C. Immunomodulators Inspired by Nature: A Review on Curcumin and Echinacea. *Molecules*. 2018;23(11).
20. Chaturvedi UC, Nagar R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;56(1):9-24.
21. Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome, *Nat. Rev. Genet*. 6: 815–825, 2005.
22. Choi HS, Kim JW, Cha YN, Kim C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem*. 2006;27(1):31-44.
23. Chuchawankul S, Khorana N, Poovorawan Y. Piperine inhibits cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Genet Mol Res*. 2012;11(1):617-27.
24. Cruvinel WM, Mesquita JD, Araujo JAP, Catela TTT, Souza AWS, Silva NP, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*. 2010;50(4):431-47.

25. Cushnie TP, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(5):377-86.
26. Daley SK, Cordell GA. Alkaloids in Contemporary Drug Discovery to Meet Global Disease Needs. *Molecules*. 2021;26(13).
27. Dambuzza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 32:21–7, 2015. doi:10.1016/j.coi.2014.12.002
28. D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(10):1308-15.
29. Debnath B, Singh WS, Das M, Giswami S, Singh MK, Maiti D, Manna K. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry*. 2018;9:56-72.
30. Drug Bank Online. Acesso em 17/08/2023. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01085>
31. Ellis PP, Littlejohn K, Deitrich RA. Enzymatic hydrolysis of pilocarpine. *Invest Ophthalmol*. 1972;11(9):747-51.
32. Etienne R, Viegas FP, Viegas JRC. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. *Ver Virtual Quim*. 2021;13(1).
33. Ferrari CKB, França EL, Honorio-França AC. Nitric oxide, health and disease. *J Appl Biomed*. 7:163-73, 2009
34. Ferreira ET, Santos ES, Monteiro JS, Gomes MS, Menezes RA, Souza MJC. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro/The use for medicinal and phytotherapy plants: an integrational review on the nurses' performance. *Braz J Health Rev*. 2019;2(3):1511-1523.
35. Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*. 7: 6198, 2012. doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445
36. Garcia-Mesa Y, Jay TR, Checkley MA, Luttge B, Dobrowolski C, Valadkhan S, et al. Immortalization of primary microglia: a new platform to study HIV regulation in the central nervous system. *J Neurovirol*. 2017;23(1):47-66.

37. Guimarães MA, Oliveira RN, de Almeida RL, Mafud AC, Sarkis ALV, Ganassin R, et al. Epiisopilosine alkaloid has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without acute toxicity. *PLoS One*. 2018;13(5).
38. Guimarães MA, Oliveira RN, Vêras LM, Lima DF, Campelo YD, Campos SA, et al. Anthelmintic activity in vivo of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003656.
39. Gutbier S, Wanke F, Dahm N, Rummelin A, Zimmermann S, Christensen K, et al. Large-Scale Production of Human iPSC-Derived Macrophages for Drug Screening. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13).
40. Hendrickson RG, Morocco AP, Greenberg MI. Pilocarpine toxicity and the treatment of xerostomia. *J Emerg Med*. 2004;26(4):429-32.
41. Herb M, Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(2).
42. Huang CH, Wang SC, Chen IC, Chen YT, Liu PL, Fang SH, et al. Protective Effect of Piplartine against LPS-Induced Sepsis through Attenuating the MAPKs/NF- κ B Signaling Pathway and NLRP3 Inflammasome Activation. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(6).
43. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 16:343–53, 2015. doi:10.1038/ni.3123
44. Kashfi K, Kannikal J, Nath N. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells*. 2021;10(11).
45. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*. 2012;2(1):1-5.
46. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-84.
47. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 34:63750, 2011. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006
48. Kemp SJ, Thorley AJ, Gorelik J, Seckl MJ, O'Hare MJ, Arcaro A, et al. Immortalization of human alveolar epithelial cells to investigate nanoparticle uptake. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(5):591-7.

49. Kuckelhaus SAS. Toxicidade e atividade antiparasitária da filosseptina-1 um peptídeo de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). 2007b. 153f. Tese – Ciências médicas. Brasília, 2007b.
50. Levin R, Grinstein S, Canton J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunol Rev.* 273:156–79, 2016. doi:10.1111/imr.12439
51. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023-.
52. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* 1997;69(2):581-93.
53. Lima DF, de Lima LI, Rocha JA, de Andrade IM, Grazina LG, Villa C, et al. Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. *PLoS One.* 2017;12(2):e0170281.
54. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145-51.
55. Lucio EMR, Rosalen PL, Sharapin N, Souza BARM. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcaloide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Rev Bras Farm.* 2000;9:23-35.
56. Mackey TK, Liang BA, Cuomo R, Hafen R, Brouwer KC, Lee DE. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: a review of key characteristics, risk factors, and the policy and innovation environment. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):949-79.
57. Mark W, Schneeberger S, Seiler R, Stroka DM, Amberger A, Offner F, et al. Sinomenine blocks tissue remodeling in a rat model of chronic cardiac allograft rejection. *Transplantation.* 2003;75(7):940-5.
58. Mendes RT, Stanczyk CP, Sordi R, Otuki MF, Santos FA, Fernandes D. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. *Ver Bras Reumatol.* 2012;52:774-782.
59. Mengarda AC, Mendonça PS, Morais CS, Cogo RM, Mazloum SF, Salvadori MC, et al. Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. *Acta Trop.* 2020;205:105350.

60. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019;50(4):892-906.
61. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(3):227-41.
62. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J*. 417: 1–13, 2009.
63. Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem*. 2007;366(2):197-206.
64. Oliveira AK, Oliveira NA, Resende UM, Martins PF. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Biol*. 2011;71(1 Suppl 1):283-9.
65. Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. Citocinas e dor. *Ver Bras Anesthesiol*. 2011;61(2): 260-5.
66. Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol*. 2002;169(11):6498-506.
67. Pereira LC, Souza, AD, Pazin M, Dorta DJ. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. *Ver Bras Toxicol*. 2012;25(1-2):1-14.
68. Pinheiro CUB. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2002;16:141-150.
69. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
70. Ramboer E, De Craene B, De Kock J, Vanhaecke T, Berx G, Rogiers V, et al. Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *J Hepatol*. 2014;61(4):925-43.
71. Ramón-Vázquez A, de la Rosa JV, Tabraue C, Castrillo A. Bone Marrow-Derived Macrophage Immortalization of LXR Nuclear Receptor-Deficient Cells. *Methods Mol Biol*. 2019;1951:75-85.

72. Rocha JA, Andrade IM, Vêras LM, Quelemes PV, Lima DF, Soares MJ, et al. Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. *Phytother Res.* 2017;31(4):624-30.
73. Rocha TM, Machado NJ, de Sousa JAC, Araujo EVO, Guimaraes MA, Lima DF, et al. Imidazole alkaloids inhibit the pro-inflammatory mechanisms of human neutrophil and exhibit anti-inflammatory properties in vivo. *J Pharm Pharmacol.* 2019;71(5):849-59.
74. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(5):379-446.
75. Sá ERA, Souza JL, Costa RKM, Barros RO, et al. Computacional investigation of the alkaloids of. *J Biomol Struct Dyn.* 2023 Apr;41(6):2555-2573.
76. Sá ERA, Costa NA, Costa RKM, Souza JL, Ramos RM, Lima FCA. In silico study of the interactions of *Pilocarpus microphyllus* imidazolic alkaloids with the main protease (M-pro) of SARS-COV-2. *Mol Simul.* 2021;47(1):74-87.
77. Santos AP; Moreno PRH. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 40(2): 115-137, 2004.
78. Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol.* 2016;64(6):1403-15.
79. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40.
80. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci.* 2015;8:77.
81. Silva VG, Silva RO, Damasceno SR, Carvalho NS, Prudêncio RS, Aragão KS, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. *J Nat Prod.* 2013;76(6):1071-7.
82. Sousa JAC, Azul FVCS, Araújo AB, Tomé RC, Silva FRM, Vasconcelos SMM, et al. Epiisopiloturine, an Alkaloid from. *Oxid Med Cell Longev.* 2023;2023:4752502.

83. Sunila ES, Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol.* 2004;90(2-3):339-46.
84. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
85. Tanzer JM, Kramer PA, Schulman P, Willard AK. A pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous pilocarpine in humans. *J Dent Res.* 1995;74(12):1845-9.
86. Tedeschi E, Kamionsky J, Fackler S, Sarel S. The isolation of purê pilosine and epiisopilosine from leaves of *Pilocarpus jaborandi*. *Israel J chem.* 1973; 11:731-733.
87. Van TA, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8:47.
88. Vêras LM, Cunha VR, Lima FC, Guimarães MA, Vieira MM, Campelo YD, et al. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. *PLoS One.* 2013;8(6):e66702.
89. Wiseman LR, Faulds D. Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. *Drugs.* 1995;49(1):143-55.
90. Xue Y, Wang Y, Feng DC, Xiao BG, Xu LY. Tetrandrine suppresses lipopolysaccharide-induced microglial activation by inhibiting NF-kappaB pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29(2):245-51.
91. Yi W, Yang D, Xu Z, Chen Z, Xiao G, Qin L. Immortalization of mouse primary astrocytes. *Gene.* 2023;865:147327.
92. Yip YL, Pang PS, Deng W, Tsang CM, Zeng M, Hau PM, et al. Efficient immortalization of primary nasopharyngeal epithelial cells for EBV infection study. *PLoS One.* 2013;8(10):e78395.
93. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, Lee AH, Franks HA, Kilpatrick L, et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6):95.