

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**ANÁLISE DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO DERIVADO
SINTÉTICO DA PIPERINA E DO EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DO
COMPOSTO SINTÉTICO E DE COMPOSTOS NATURAIS EM LINHAGENS
DE MACRÓFAGOS MURINOS E CANINO.**

RAÍSSA COUTO SANTANA

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ANÁLISE DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO DERIVADO
SINTÉTICO DA PIPERINA E DO EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DO
COMPOSTO SINTÉTICO E DE COMPOSTOS NATURAIS EM LINHAGENS
DE MACRÓFAGOS MURINOS E CANINO.**

RAÍSSA COUTO SANTANA

Sob orientação da professora

Dra. Lucia Helena Pinto da Silva

e Co-orientação da professora

Dra. Gabriela Santos-Gomes

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau
de **Doutora em Ciências** no
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ

Setembro, 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

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

S231

Santana, Raíssa Couto, 1994-
Análise da Atividade Leishmanicida do Derivado
Sintético da Piperina e do Efeito Imunomodulatório do
Composto Sintético e de Compostos Naturais em
Linhagens de Macrófagos Murinos e Canino. / Raíssa
Couto Santana. - Rio de Janeiro, 2023.
103 f.: il.

Orientadora: Lucia Helena Pinto da Silva .
Coorientadora: Gabriela Santos-Gomes.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2023.

1. Atividade imunomoduladora. 2. Tratamentos. 3.
Produtos naturais e sintéticos. I. da Silva , Lucia
Helena Pinto , 1975-, orient. II. Santos-Gomes,
Gabriela , -, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.



ATA N° 3824/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.063462/2023-65

Seropédica-RJ, 20 de setembro de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

RAISSA COUTO SANTANA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor(a)** em Ciências, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 20/09/2023

(Assinado digitalmente em 21/09/2023 09:20)
DEBORA DECOTE RICARDO DE LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: ####227#6

(Assinado digitalmente em 20/09/2023 17:33)
LUCIA HELENA PINTO DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: ####458#0

(Assinado digitalmente em 20/09/2023 17:37)
VERONICA FIGUEIREDO DO AMARAL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.787-##

(Assinado digitalmente em 20/09/2023 17:13)
LEONARDO FREIRE DE LIMA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.257-##

(Assinado digitalmente em 20/09/2023 17:39)
RENATO PORROZZI DE ALMEIDA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.207-##

*Para Célia Cunha de Carvalho[†],
Eduarda Botelho da Silva[†] e
Elizabeth da Silva Pimental[†].*

Agradecimentos

Começo agradecendo a meus pais Anizio Joaquim de Santana Neto e Rosilane Couto por me incentivarem sempre a estar estudando e por me proporcionar o melhor que poderiam na minha educação e na minha criação. Ao meu irmão por ser também meu amigo e pra quem tento ser a pessoa com que ele possa sempre contar. Seguindo minha jornada, eles estavam sempre me apoiando nas minhas decisões e sempre prontos para me receber de volta. A minha Tia Marilane Couto e a minha avó Maria Aparecida que ajudaram a me criar e hoje espero se orgulhar de quem me tornei. Ao meu primo com quem fui criada junto e por ser uma pessoa que tenho muito carinho.

Agradeço a minha Tia que se foi pelos momentos maravilhosos que tive em sua casa e em sua presença. As minhas primas que são mulheres incríveis.

Agradeço as minhas famílias, todos eles.

Agradeço por tudo que vivi com a minha Duda.

Agradeço aos amigos que fiz nessa universidade e que dividi todos os problemas e os momentos bons. Nossa turma sempre foi muito unida e sempre procuramos nos ajudar e dar apoio uns aos outros até hoje. Não poderia ser mais grata estudando o que eu gosto com pessoas que se tornaram queridas.

Agradeço a minha amiga Emily, que compartilhei praticamente toda trajetória dentro da universidade e tudo para além dela.

Agradeço ao meu amigo Ivison, que conheci pela metade desse tempo, mas que está e é a pessoa mais próxima de mim que qualquer um.

Agradeço a minha amiga Manuela, que junto da Emily se tornou uma companheira desde que dividimos a mesma casa em Seropédica.

Agradeço ao laboratório de imunologia e virologia veterinária da UFRRJ pelos quase 10 anos que estive lá e as pessoas que conheci. Alguns de passagem, outros me acompanhando até aqui. Aprendi muito com todos e dividi o que aprendia. Agradeço a Renata, nossa técnica, minha amiga por me ajudar além do trabalho e por ser tão companheira. Agradeço a Beatriz, Alice, Paulo, Camila, minha xará Raissa Nascimento

entre outros nessas idas e vindas do laboratório. Pude conhecer pessoas maravilhosas que me proporcionaram muita alegria.

Agradeço imensamente aos professores Sieberth do Nascimento Brito, Debora Regina Lopes dos Santos, Débora Decoté Ricardo de Lima, Danielle de Oliveira Nascimento, Maria das Gracas Miranda Danelli pelos conhecimentos, companheirismo e mais que isso, por serem profissionais incríveis e pessoas melhores ainda.

Agradeço imensamente a minha orientadora profa. Lucia Helena Pinto da Silva, uma mãe. Me acolheu e se empenhou a me ensinar tudo que podia, me incentivando a buscar mais e que não para de acreditar em mim. Devo a ela muita coisa do que hoje eu sei.

Agradeço a Professora Patrícia Fampa Negreiros Lima do Laboratório de Parasitos e Vetores e suas alunas Dayana Palmeira da Silva Rosa e Melissa Cristina Moraes Florencio. Primeiro por me receber em seu laboratório e por ser meu primeiro contato com o meio científico e ser minha ponte com a profa Lucia. Segundo por estarmos sempre nos ajudando e colaborando nos trabalhos.

Agradeço aos membros do Laboratório de Imunomodulação da UFRJ: Professor Célio Geraldo de Freire Lima, Joana, Elias, Israel, Idália, Brenda, Melissa e novamente a muitos outros que pude conhecer. Agradeço mais ainda a Joyce que se tornou uma grande amiga e companheira que sempre pude contar para literalmente tudo e para me ajudar no que fosse preciso.

Agradeço ao Prof. Áislan de Carvalho Vivarini da Universidade Federal Fluminense (UFF) pela ajuda na realização dos dados de PCR desse trabalho.

Agradeço a Prof Daniela Cosentino Gomes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela ajuda na realização dos dados de ROS desse trabalho.

Agradeço a Professora Gabriela Santo-gomes do laboratório do grupo Vector-Borne Diseases and Pathogens do Centro R&D Global Health and Tropical Medicine (GHTM) no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), que me recebeu muito bem em Portugal e em seu laboratório e a quem tive uma ótima receptibilidade. Aos amigos que fiz lá, Armanda, George, Ana Bolas, Lis Lobo, Flavia, Mafalda, Marta. Foram momentos ótimos de muita aprendizagem e alegria.

Agradeço aos meus amigos que fiz em Portugal, Levi, Caio, Rui e Rebeca que dividi a casa e ao Junior Augusto. São pessoas incríveis no qual compartilhei momentos muito felizes enquanto estive lá.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem o convite de ler e acrescentar seu conhecimento no meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa e pelo auxílio financeiro para a execução dos trabalhos desta Tese no Brasil.

Agradeço à FCT—Foundation for Science and Technology (PTDC/CVT-CVT/28908/2017 e PTDC/CVT-CVT/0228/2020 no âmbito de Saúde Global e Medicina Tropical - GHTM, UID/04413/2020) que permitiram que parte da Tese fosse realizado no exterior.

Esse trabalho foi realizado durante um período atípico que foi a Pandemia de COVID 19. Foi um período difícil para todos os pesquisadores que tiveram que parar muitos de seus projetos e lidar com a limitação do trabalho que impactou a pesquisa de todos. Esse último ano de doutorado, foi um ano bem difícil para mim. Perdi pessoas queridas e por estar no fim do meu doutorado, foram momentos bastante conturbados. Mas consegui e fico feliz por terminar meu trabalho.

Resumo

SANTANA, Raíssa Couto. **Análise da atividade leishmanicida do derivado sintético da piperina e do efeito imunomodulatório do composto sintético e de compostos naturais em linhagens de macrófagos murinos e canino.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Os macrófagos são células fagocíticas presentes em diversos órgãos envolvidos na homeostase e proteção dos tecidos. Os macrófagos são as células hospedeiras do parasita *Leishmania* sp. agente causador da leishmaniose que alige 1 milhão de pessoas anualmente. Os medicamentos são tóxicos e extremamente caros. Produtos naturais apresentam ação farmacológica com fácil acesso e na maioria seguros, além de apresentarem estruturas químicas que permitem modificações para seu aperfeiçoamento. Nossa grupo demonstrou anteriormente que 2 produtos naturais, (-)-Guaiol e Piperina (AF1) apresentam atividade leishmanicida para espécies de *Leishmania amazonensis*. Nesse trabalho confirmamos essa ação dos compostos naturais e estudamos pela primeira vez a atividade antileishmania do derivado sintético de piperina N4-cyclohexyl-1,2,4-triazol-3-thione (AF2). Avaliamos também a ação imunomoduladora dos compostos em diferentes linhagens celulares de macrófagos murinos P388D1 e RAW 264.7 e canino DH82. Os compostos demonstraram uma atividade leishmanicida *in vitro* para promastigotas de *L. amazonensis* com IC₅₀ de 56.24 µM, 9.36 µM e 8.73 µM para (-)-Guaiol, AF1 e AF2, respectivamente. As linhagens celulares apresentaram viabilidade acima de 70% após tratamentos com os compostos. AF2 na concentração de 50 µM diminuiu a atividade fagocítica de DH82 após desafio com formas promastigotas. Os tratamentos com os compostos levaram a modulação na produção de NO e ROS e alterou a expressão de moléculas MHC I/II, CD80 e CD86 nas diferentes linhagens. Por fim, resultados de qPCR demonstram que linhagem RAW 264.7 e DH82 aumentam a expressão de mRNA da citocina IL 10 após tratamento com (-)-Guaiol e AF1 enquanto que os compostos diminuem a expressão de IL 10, IL 12, TLR4 e TLR9 nessas células quando estimuladas com LPS. A linhagem celular P388D1 em repouso e tratadas com (-)-Guaiol e AF1 levaram a uma redução da expressão de TLR4. Os resultados sugerem que o efeito dos compostos pode ser diferente dependendo do tipo celular.

Palavras-chave: Atividade imunomoduladora, tratamentos, produtos naturais e sintéticos.

Abstract

SANTANA, Raíssa Couto. **Analysis of the leishmanicidal activity of the synthetic piperine derivative and the immunomodulatory effect of the synthetic compound and natural compounds in murine and canine macrophage lines.** Thesis (Doctoral's in veterinary sciences), Veterinary Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Macrophages are phagocytic cells situated in various organs involved in homeostasis and tissue protection. Macrophages are the host cells of the *Leishmania* sp. parasite causative agent of leishmaniasis that afflicts 1 million people annually. The treatments are toxic and extremely expensive. Natural products have pharmacological activity that is easy to access and mostly safe to use. In addition, having chemical structures that allow modifications for improvement. Our group previously demonstrated that 2 natural products, (-)-Guaiol and Piperine (AF1) have leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* species. In this work, we confirmed this activity of natural compounds and studied for the first time the antileishmanial activity of the synthetic piperine derivative N4-cyclohexyl-1,2,4-triazol-3-thione (AF2). We also evaluated the immunomodulatory activity of the compounds in different macrophages cell lines of murine (P388D1 and RAW 264.7) and canine DH82. The compounds demonstrated *in vitro* leishmanicidal activity for *L. amazonensis* promastigotes with IC₅₀ of 56.24 µM, 9.36 µM and 8.73 µM for (-)-Guaiol, AF1 and AF2, respectively. The cell lines showed viability above 70% after treatment with the compounds. AF2 at a concentration of 50 µM decreased the phagocytic activity of DH82 after challenge with promastigote forms. Treatment with the compounds modulate the production of NO and ROS and altered the expression of MHC I/II, CD80 and CD86 molecules in different lineages. Finally, qPCR results demonstrate that RAW 264.7 and DH82 strains increase the mRNA expression of the cytokine IL-10 after treatment with (-)-Guaiol and AF1, while the compounds decrease the expression of IL-10, IL-12, TLR4 and TLR9 in these cells when stimulated with LPS. Resting cell line P388D1 treated with (-)-Guaiol and AF1 led to a reduction in TLR4 expression. The results suggest that the effect of the compounds may be different depending on the cell type.

Keywords: Immunomodulatory activity, treatment, natural and synthetic products.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

1.0 Quadro de primers utilizados para análise de expressão gênica através de qPCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** “Elie Metchnikoff e seus desenhos da fagocitose bacteriana por macrófagos e micrófagos”. Tradução própria. Adaptado de: KAUFMANN, 2008.....4
- Figura 2. Ontogenia do macrófago tecidual.** Os macrófagos surgem no embrião em 3 etapas diferentes conhecido como “ondas”. A primeira onda surge no saco vitelino que dá origem a macrófagos na microglia, seguido da segunda onda que migram para o fígado fetal ou se diferenciam localmente em macrófagos do saco vitelino. A última onda é de origem hematopoética que segue para o baço e a medula óssea. Adaptado e traduzido de: WU; HIRSCHI, 2021.....6
- Figura 3. Macrófagos nos tecidos e algumas das suas atuações.** Os macrófagos que compõe os órgãos são células e que participam de diversos processos metabólicos associados ao mesmo e apresentam diferenças entre si. Adaptado de: MASS et al., 2023; PARK et al., 2022.....7
- Figura 4. Fenótipos de Macrófagos.** Macrófagos com ativação clássica (M1) são células efetoras e eficientes na eliminação de micro-organismos patogênicos. Macrófagos com ativação alternativa (M2) vão iniciar a reparação tecidual e retomar a homeostase.....12
- Figura 5. Ciclo Biológico da *Leishmania* sp.** Durante a alimentação sanguínea, o flebotomíneo fêmea injeta formas promastigotas metacíclicas que irão infectar os macrófagos dos hospedeiros mamíferos. Nessas células, os parasitos na forma amastigota se multiplicam rompendo a célula e infectando outras ao redor. Numa nova alimentação o flebotomíneo irá ingerir formas amastigotas dando continuidade ao ciclo. Adaptado de: SYKES, BANETH, PETERSEN, 2013.....17
- Figura 6. Aplicações do cultivo celular.** O estabelecimento de linhagens celulares permitiu o desenvolvimento de diversas áreas favorecendo o avanço das pesquisas científicas. Adaptado e traduzido de: FRESHNEY, 2011.....22
- Figura 7. Estrutura química do (-)-Guaiol.** Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.....26
- Figura 8. Estrutura química da Piperina (AF1).** Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.....29
- Figura 9. Estrutura química do N4-cyclohexyl-1,2,4-triazole-3-thione (AF2).** Adaptado: (FRANKLIM et al., 2013).....32
- Figura 10. Atividade leishmanicida.** Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas na presença dos compostos em diferentes concentrações por 48h/26°C. A inibição do crescimento celular foi analisada pelo teste colorimétrico de XTT de atividade mitocondrial. Os resultados são expressos em média \pm SEM. **** P \leq 0,001, *P $<$ 0,05 estatisticamente significantes em relação ao respectivo DMSO. DMSO 0,6% e 0,2% = controle negativo; Anfotericina [1 μ g/mL] e solução de Azida Sódica 2% = controle positivo.....42
- Figura 11. Viabilidade das linhagens celulares.** Linhagens de macrófagos murinos P388D1 (A), RAW 264.7 (B) e canina DH82 (C) foram plaqueadas e tratadas com os

compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2 em diferentes concentrações por 48h. A viabilidade celular dos macrófagos foi avaliada pelos testes colorimétricos Rezasurina (P388D1) e XTT (RAW 264.7 e DH82) para avaliação de atividade mitocondrial. Os dados são expressos em média \pm SEM. ****P \leq 0.0001 estatisticamente significante em relação ao DMSO. DMSO 0.2% = controle negativo; Solução de Azida Sódica 2% e Solução de paraformaldeído 2% = controle positivo.....44

Figura 12. Atividade fagocítica. Linhagens de macrófagos murina RAW 264.7 (A) e canina DH82 (B) foram plaqueadas e tratadas com 50 μ M dos compostos ((-)-Guaiol, AF1 e AF2) por 24h. Após esse tempo as células foram desafiadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5p:1mo por 2h e então fixadas em metanol e coradas com Giemsa. O índice fagocítico foi determinado pela contagem de no mínimo 200 células. Os dados são expressos em média \pm SEM. **P \leq 0.01 e *P $<$ 0.05 estatisticamente significante em relação ao controle. DMSO 0.2% = controle negativo..46

Figura 13. Avaliação da produção de óxido nítrico de linhagens celulares. Macrófagos em repouso ou ativados com 100 ng/mL (RAW - B), 1 μ g/mL (DH82 - C) e 10 μ g/mL (P388D1 - A) de LPS foram tratados ou não com 50 μ M ou 60 μ M de (-)-Guaiol, AF1 e AF2 por 48 horas. As linhagens celulares foram recolhidas e marcadas com sonda fluorescente DAF-FM para a análise de concentração de NO. Os dados são expressos em média \pm SEM. ****P \leq 0.0001, **P \leq 0.01 e *P $<$ 0.05 estatisticamente significante.....48

Figura 14. Avaliação da produção de radicais de oxigênio de linhagens celulares. Macrófagos em repouso ou ativados com 100 ng/mL (RAW 264.7 - C), 1 μ g/mL (DH82 - B) e 10 μ g/mL (P388D1 - A) de LPS foram tratados ou não com 50 μ M (RAW 264.7 e DH82) e 60 μ M (P388D1) de (-)-Guaiol, AF1 e AF2 por 48 horas. A quantificação de ROS foi analisado por fluorescência através da reação com o reagente Amplex Red. Os dados são expressos em média \pm SEM. ****P \leq 0.0001, **P \leq 0.01 e *P $<$ 0.05 estatisticamente significante. Os gráficos de RAW 264.7 e DH82 são representativos de 2 experimentos independentes em triplicata enquanto o gráfico de P388D1 é relativo a 1 experimento em triplicata.....50

Figura 15. Expressão de moléculas de MHC e co-estimulatórias nas diferentes linhagens celulares após o tratamento. Macrófago murino P388D1 em repouso ou infectadas com *L. amazonensis*, macrófagos murinos RAW 264.7 em repouso ou estimuladas com LPS (100 ng/mL) + INF- γ (20 ng/mL) e macrófagos caninos DH82 não estimuladas ou estimuladas com LPS (2 μ g/mL) foram tratadas ou não com 50 μ M (RAW 264.7 e DH82) ou 60 μ M (P388D1) dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2. Após 48h, as células foram fixadas e marcadas com anticorpos para moléculas MHC I/II, CD80 e CD86 seguido de análise por citometria. A, C e E gráficos Zebra Plot da marcação celular. B, D e F gráficos representativos do Zebra Pot. NM – Células não marcadas; *L.a* – *Leishmania amazonensis*. Os resultados são expressos em média \pm SEM ****P \leq 0.0001, ***P \leq 0.001, **P \leq 0.01 e *P $<$ 0.05 estatisticamente significante. Gráfico DH82 referente a 1 experimento com análise de 50.000 eventos.....56

Figura 16. Expressão de citocinas e receptores TLR nas diferentes linhagens celulares após o tratamento. Linhagem celular P388D1 (A) em repouso foram tratadas com os compostos ((-)-Guaiol, AF1 e AF2) na concentração de 60 μ M. Linhagens RAW 264.7 (B) e DH82 (C) não estimuladas e estimuladas com LPS (100ng/mL e 1 μ g/mL respectivamente) foram tratadas com 50 μ M dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2. Após

48h o mRNA foi extraído para quantificação por PCR em tempo real da expressão de citocinas e receptores de reconhecimento padrão. Os dados obtidos foram normalizados utilizando primers para gene endógeno HPRT ou GAPDH respectivamente. Os resultados são expressos em média \pm SEM. **** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ e * $P < 0.05$ estatisticamente significante.....60

Figura 17. Ação imunomoduladora dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2 em linhagens celulares murinas e caninas. RAW 264.7 (A), DH82 (B) e P388D1 (C).....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AF1 – Piperina

AF2 - *N4-cyclohexyl-1,2,4-triazol-3-thione*

AGM - Aorta-gônada-mesonefro (*aorta-gonad-mesonephros*)

APC's – Células apresentadoras de antígeno (*Antigen Presenting Cells*)

ATP - Adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*)

CD - Cluster de diferenciação (*Cluster of differentiation*)

CDC – Centro de controle e prevenção de doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*).

cDNA – DNA complementar

cMoP - Progenitores comuns de monócitos (*common monocyte progenitors*)

CMP - Progenitores comuns mieloides (*common myeloid progenitor*)

CNS - Sistema nervoso central (*Central nervous system*)

CpG – Oligonucleotídeos de citosina seguidos de guanina (*CpG oligonucleotide*)

CSF-1R – Receptor do fator estimulador de colônia 1 (*Colony stimulating factor 1 receptor*)

DAF-FM Diacetate - *4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate*

DAMP's - Moléculas associadas a danos (*Damage-associated molecular pattern*)

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido (*Dimethyl sulfoxide*)

DNA - Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

ERK - *Extracellular signal-regulated kinase*

Fc - Receptores Fc (*Fc receptors*)

Fc γ - Receptores gama Fc (*Fc gamma receptors*)

FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*Isotiocianato de fluoresceína*)

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

Fig - Figura

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GM-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator*)

GMP - Progenitores de granulócitos-monócitos (*granulocyte-monocyte progenitor*)

GP63 - Glicoproteína de 63 kDa ou leishmanolisina (*Glycoprotein 63 or leishmanolisi*)

GR - Glutathione redutase (*Glutathione Reductase*)

GSH - Glutathione reduzida (*Reduced glutathione*)

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio (*Hydrogen peroxide*)

HeLa – Células de linhagem celular de Henrietta Lacks

HIV - Vírus imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

HMGB1- *highmobility group box 1 protein*

HPR – Enzima *Horseradish peroxidase*

HPRT – Hipoxantina-guanina Fosforribosiltransferase (*Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*)

HSC – Células-tronco hematopoiéticas (*haematopoietic stem cells*)

HSP – Proteína de choque térmico (*Heat-shock proteins*)

IC₅₀ - Concentração inibitória

Ig – Imunoglobulinas (*Immunoglobulins*)

IL – Interleucinas (*Interleukins*)

INF-γ – Interferon gama (*Interferon-gamma*)

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (*Inducible nitric oxide synthase*)

JNK - *c-Jun N-terminal kinase*

LC - Leishmaniose Cutânea

Linfócitos T CD4 – Linfócitos T auxiliares

Linfócitos T CD8 – Linfócitos T citotóxicos

LPG – Lipofosfoglicano (*Lipophosphoglycan*)

LPS – Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharides from Escherichia coli*)

LV - Leishmaniose Visceral

Mac-1 – Integrina $\alpha M\beta 2$ ou Antígeno de macrófago – 1 (*integrin $\alpha M\beta 2$ or Macrophage 1 antigen*)

Mac-2 – *Lectin Galectin-3*

MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1*

MDP - Progenitor comum monócito-DC (*monocyte dendritic cell progenitor*)

MHC I e II – Complexo de Histocompatibilidade I e II (*Major Histocompatibility Complex I and II*)

mRNA – RNA mensageiro (*Messenger RNA*)

mTOR - *Mechanistic target of rapamycin*

NADPH - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NF κ B - *factor nuclear kappa B*

NO - Espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species*).

NO₂⁻ - Nitrito

NOD - *Nucleotide-binding and oligomerization domain*

O₂⁻ - Ânion superóxido (*superoxide anion*)

OE – Óleos essenciais – Essential oils

ONOO⁻ - Peroxinitrito

P2X7R - *Purinergic ligand-gated ion channel 7 receptor*

Pam3CSK4 – Lipopeptídeo sintético (*Pam3CysSerLys4*)

PAMP's - Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern*)

PBS – Tampão Fosfato-Salino (*phosphate buffered saline*)

PCR – Reação em cadeia polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PE – Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

pH- Potencial Hidrogeniônico

PMA – *Phorbol-12-miristato-13-acetato*

PMS - *Phenazine Methosulfate*

PNS - Sistema nervoso periférico (*Peripheral Nervous System*)

Poly I:C - *Polyinosinic-polycytidylc acid*

PRR's - Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptors*)

RNS - Espécies reativas de nitrogênio (*Reactive nitrogen species*)

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

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute-1640 medium*

RTM – Macrófagos residentes do tecido (*macrophage tissue residente*)

qPCR – Reação em cadeia polimerase em tempo real (*Real time polymerase Chain Reaction*)

SEM – *Standard Error of the Mean*

SFB – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

STAT - *Signal transducer and activator of transcription*

TGF-β - Fator de crescimento transformador beta (*transforming growth factor-beta*)

Th – Subpopulação de linfócito T auxiliar (*T helper*)

TLR's - Receptores semelhantes a Toll (*Toll-Like receptors*)

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

WHO/OMS - Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

XTT - *2,3-Bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl] -2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt.*

×g - força centrífuga relativa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Ontogenia do Macrófago.....	4
2.2 Macrófagos.....	7
2.3 Fenótipos.....	10
2.4 Relação com parasitas intracelulares: <i>Leishmania spp.</i>	13
2.5 Cultivos celulares como ferramenta para estudos biológicos.....	20
2.6 Produtos Naturais.....	25
2.6.1 (-)-Guaiol.....	26
2.6.2 Piperina.....	29
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Compostos Químicos.....	35
4.2 Parasitos.....	35
4.3 Macrófagos.....	35
4.4 Inibição do Crescimento de promastigotas.....	36
4.5 Ensaio de Citotoxicidade de macrófagos.....	36
4.6 Análise da atividade fagocítica.....	37
4.7 Dosagem de óxido nítrico.....	37
4.8 Dosagem de radicais de oxigênio.....	38
4.9 Citometria.....	38
4.10 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time PCR).....	39
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Atividade citotóxica dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	41
5.1.1 Atividade leishmanicida dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	41
5.1.2 Análise da citotoxicidade em linhagens celulares tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	43
5.2 Análise do efeito imunomodulador dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	45
5.2.1 Avaliação da atividade fagocítica das linhagens tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	45
5.2.2 Avaliação da produção de óxido nítrico das células tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	47

5.2.3 Avaliação da produção de radicais de oxigênio das linhagens tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	49
5.2.4 Análise da expressão de moléculas MHC e co-estimulatórias nas linhagens de macrófagos tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	51
5.2.5 Expressão de citocinas e receptores TLR das linhagens celulares tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.....	57
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	72
8 BIBLIOGRAFIA.....	74

1 INTRODUÇÃO

Os macrófagos são células do sistema imunológico que participam da resposta inata e adaptativa e que compõe estruturalmente diversos órgãos fazendo parte de atividades fisiológicas, fagocitando células mortas danificadas e/ou senescentes e partículas não patogênicas garantindo o estado homeostático do órgão. Na defesa do organismo, essas células têm a versatilidade de se diferenciar em perfis de ativação cruciais que podem determinar a trajetória de uma doença.

Por muito tempo o conhecimento que se tinha dessa célula era da sua relação direta com monócitos e sua função essencialmente era ingerir micro-organismos, células senescentes e抗ígenos solúveis e que ocasionalmente podiam apresentá-los aos linfócitos. Porém essas células se mostraram estar além dessas funções básicas no organismo. Os macrófagos surgem logo no embrião e com o desenvolvimento do mesmo vão migrando para outros tecidos do corpo onde fazem parte do arcabouço de órgãos importantes. Nos tecidos, eles desenvolvem características únicas para desempenhar diferentes funções nos órgãos que vão desde a participação nos processos biológicos como sinapses nervosas, removendo eritrócitos senescentes, tolerância imunológica, metabolismo energético, defesa do corpo da entrada de patógenos, suporte ósseo entre outros (Mass, 2018; Park et al., 2022).

Em uma infecção, macrófagos inflamatórios M1 são células que promovem a eliminação do patógeno no sítio de infecção liberando citocinas e quimiocinas, que vão ativar outras células ao redor. Eles também fagocitam e destroem os micro-organismos e apresentam os fragmentos aos linfócitos T para ativação de um perfil Th1 e uma resposta imunológica mais específica e duradoura. Macrófagos M2 são encontrados no final da infecção quando é necessário a volta do estado homeostático e resolução do tecido podendo ter participação dos linfócitos com um perfil Th2. Medicamentos que possam direcionar uma melhor ativação do macrófago podem auxiliar na terapia de diversas doenças (Atri; Guerfali; Laouini, 2018; Murphy, 2014, p. 335-382; Yunna et al., 2020).

Os macrófagos são alvo de agentes patogênicos que utilizam da sua alta capacidade de diferenciação para escapar da ação microbicida do sistema imunológico. A leishmaniose é uma doença zoonótica que circula principalmente em regiões desprovidas de sistema básico de saúde e higiene. Sendo considerada uma doença

negligenciada, estima-se que a leishmaniose pode acometer mais de 1 milhão de pessoas anualmente segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS - WHO). Nesse cenário, o Brasil é um dos países que mais reportam casos de leishmaniose cutânea e visceral.

O parasito transmitido pelo flebotomíneo tem o macrófago como sua célula hospedeira. Dentro dele, o parasito possui estratégias para não ser destruído e colonizar a célula, se multiplicar e se estabelecer. A infecção gera diversas manifestações clínicas sendo a mais comum a leishmaniose cutânea podendo ter a cura espontânea e a mais grave sendo a leishmaniose visceral que pode levar a morte se não tratada. Essas manifestações vão estar relacionadas ao "background" genético do hospedeiro, a infectividade da cepa, ao estado imunológico do paciente entre outras condições que podem influenciar no quadro clínico. Como dito anteriormente, a leishmaniose também pode acometer os animais e possui grande interesse médico veterinário já que o cão é o principal reservatório. Os fármacos de uso são datados de mais de 100 anos, de difícil administração e tóxicos. Formulações mais eficazes e menos prejudiciais possuem um custo mais elevado e há cada vez mais relatos de cepas resistentes (Hendrickx; Caljon; Maes, 2019; Sasidharan; Saudagar, 2021).

Produtos naturais são fontes medicinais ancestrais de moléculas ativas que podem ser benéficas e na maioria das vezes de baixa toxicidade. A ciência explora a capacidade de modificação e aprimoramento dos substratos químicos derivados de plantas para a formulações de medicamentos. Pesquisas básicas que visam entender a ação biológica desses produtos se utilizam de linhagens celulares de animais como fonte de dados iniciais para futuros testes em laboratório com organismos mais complexos onde somente os mais eficientes são escolhidos e possivelmente selecionados para gerar um produto de uso farmacológico. A busca por novos agentes terapêuticos direciona o foco para a grande diversidade da flora e fauna que alberga uma infinidade de substâncias ainda pouco exploradas.

O (-)-Guaiol é um sesquiterpeno presente no óleo essencial (OE) de *Aloysia gratíssima* e ambos foram estudados pelo nosso grupo demonstrando possuir atividade leishmanicida tanto para formas promastigotas quanto amastigotas de *L. amazonensis*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea nas américas, *in vitro*. O composto causa modificações ultraestruturais em formas promastigotas do parasito enquanto é capaz de inibir a sobrevivência de amastigotas em macrófagos infectados com um IC₅₀

de 0.01 μgmL^{-1} (Garcia et al., 2018). Outro trabalho do nosso grupo com piperina, presente nos extratos de *Piper nigrum*, apontou que o composto (50 μM) possui um efeito leishmanicida assim como seus outros derivados sintéticos no modelo de *L. amazonensis* levando a deformação e perda de potencial mitocondrial do parasito além de alteração no ciclo celular e no metabolismo lipídico (Ferreira et al. 2011). Nadaes e colaboradores (2020) trabalharam com linhagens de macrófagos caninos DH82 e linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 e mostram que estas células possuem um perfil de ativação e de infecção diferente por *L. amazonensis* e *L. infantum*. Nesse trabalho estudamos pela primeira vez a atividade leishmanicida do derivado sintético de piperina N4-cyclohexyl-1,2,4-triazole-3-thione (AF2), um híbrido sintetizado com parte da estrutura do protoconazol conhecido por inibir a enzima CYP51 presente na via de síntese de ergosterol em *Leishmania*. Também averiguamos a ação imunomoduladora de AF2 e dos compostos (-)-Guaiol e piperina (AF1) em linhagens celulares de macrófagos murinos (RAW 264.7 e P388D1) e caninos (DH82) estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano. Os resultados visam analisar os mecanismos de ação farmacológica e enriquecer os estudos sobre esses compostos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ONTOGENIA DO MACRÓFAGO

A descoberta das células fagocíticas são de autoria do cientista russo Ilya Mechnikov ou Élie Metchnikoff. Ele observava estruturas com formato de ameba que interagiam com os micro-organismos a que eram expostas. Apesar de encontrar certa relutância em estabelecer sua teoria das células fagocíticas no meio acadêmico, seu estudo lhe garantiu um prêmio Nobel em 1908 (**Figura 1**) (Gordon, 2016). Van furth e Cohn (1968) em seu estudo do sistema mononuclear fagocítico correlacionou a origem dos macrófagos com os monócitos circulantes no sangue, que por sua vez surgiram na medula óssea a partir de um progenitor pro-monócito.

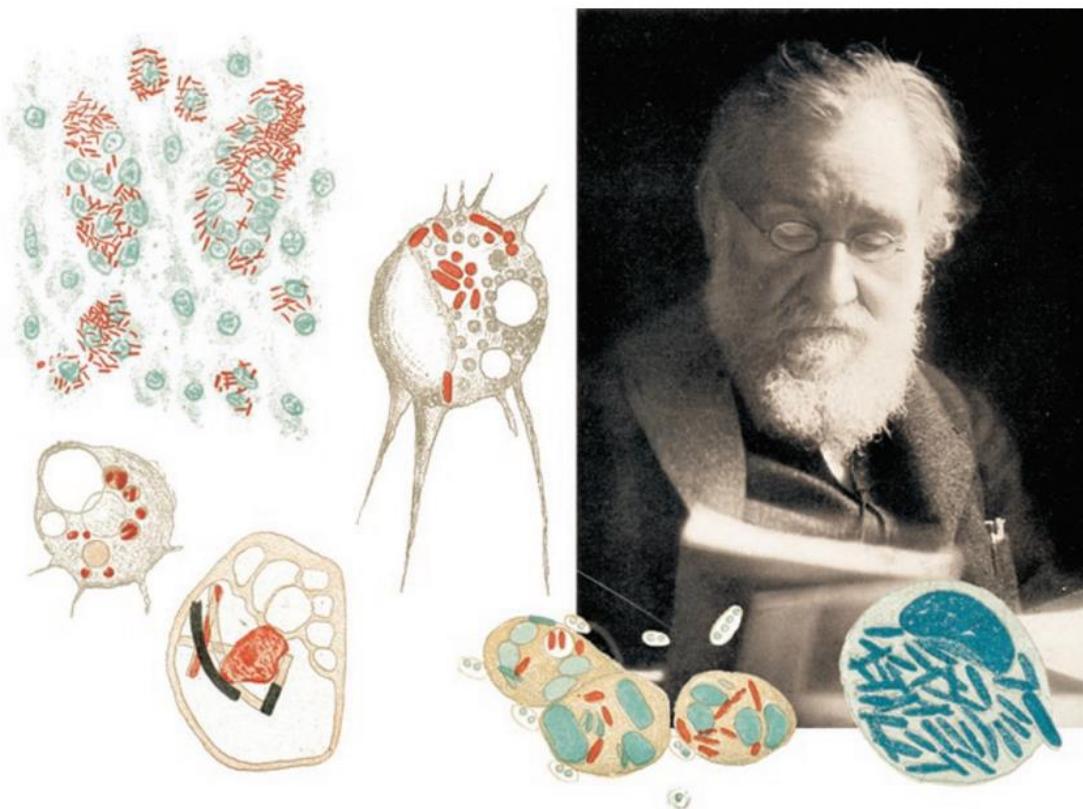


Figura 1. “Elie Metchnikoff e seus desenhos da fagocitose bacteriana por macrófagos e micrófagos”. Tradução própria. Adaptado de: Kaufmann, 2008.

A origem dos macrófagos foi revista ao longo dos anos utilizando-se de modelos de *fate-mapping* e ao estudar embriões durante a gestação de camundongos. Os macrófagos surgem em 3 “ondas” de precursores, que se distinguem da origem tecidual e do tempo de desenvolvimento (Wu; Hirschi, 2021) (**Figura 2**). A gênese dos macrófagos provém do período embrionário. Nos casos dos camundongos, com 7 dias de formação o embrião apresenta a expressão de fatores de transcrição de desenvolvimento hematopoiético iniciando a produção da sua população celular de eritrócitos e de precursores de macrófago localizados majoritariamente no saco vitelino (Palis et al., 1999).

A região extraembrionária é primordialmente colonizada com células CD45⁺ de origem materna (CD45⁺ cKit⁻, Mac-1⁺ F4/80⁺), mas logo surge precursores que darão origem somente a macrófagos seguido de precursores eritromieloides (PEM - eritrócitos, granulócitos e macrófagos) ambos CD45⁻ cKit⁺ na região conhecida como ilhas de sangue no saco vitelino (Bertrand et al., 2005). Posteriormente, Hoeffel e colaboradores (2015) sugerem que ambas as populações são eritromieloides com dias de surgimento distintos (7 dias e 8 dias respectivamente) (Hoeffel et al., 2015). A partir do 9º dia, os precursores de macrófagos com o tempo vão expressando CD45, CSF-1R e perdem sua capacidade de proliferação (Bertrand et al., 2005; Ginhoux et al., 2010). Os precursores de macrófagos migram para o cérebro após surgimento da circulação sanguínea para formar a microglia no mesênquima cefálico (Ginhoux et al., 2010; Palis et al., 1999).

A população que surge posteriormente forma-se no endotélio hemogênico e desenvolve o marcador cMyb⁺ e seguem para o fígado, para se diferenciar e depois seguirão para os tecidos. onde vão se diferenciar em populações celulares distintas dentre elas os macrófagos que irão para o tecido. Essa população também pode se diferenciar localmente em macrófagos do saco vitelino (Hoeffel et al., 2015; McGrath et al., 2015; Palis et al., 1999). Takahashi; Yamamura; Naito (1989) observaram no 9 dia de gestação uma população no saco vitelino com formato redondo, porém irregular e projeções da membrana e núcleo proeminente. Os autores denominaram de “macrófago primitivo” e que teriam sua formação antes do surgimento dos promonócitos (Takahashi; Yamamura; Naito, 1989).

Por fim, as células hematopoiéticas surgem na região da aorta-gônada-mesonefros (AGM) (Boisset et al., 2010; Medvinsky; Dzierzak, 1996). As células migram do AGM a partir do 12º dia de gestação e se alojam no fígado fetal (Kumaravelu et al., 2002). Com

o crescimento do embrião as células vão gradualmente se direcionando para a medula óssea e o baço conforme vão se desenvolvendo (Christensen et al., 2004).

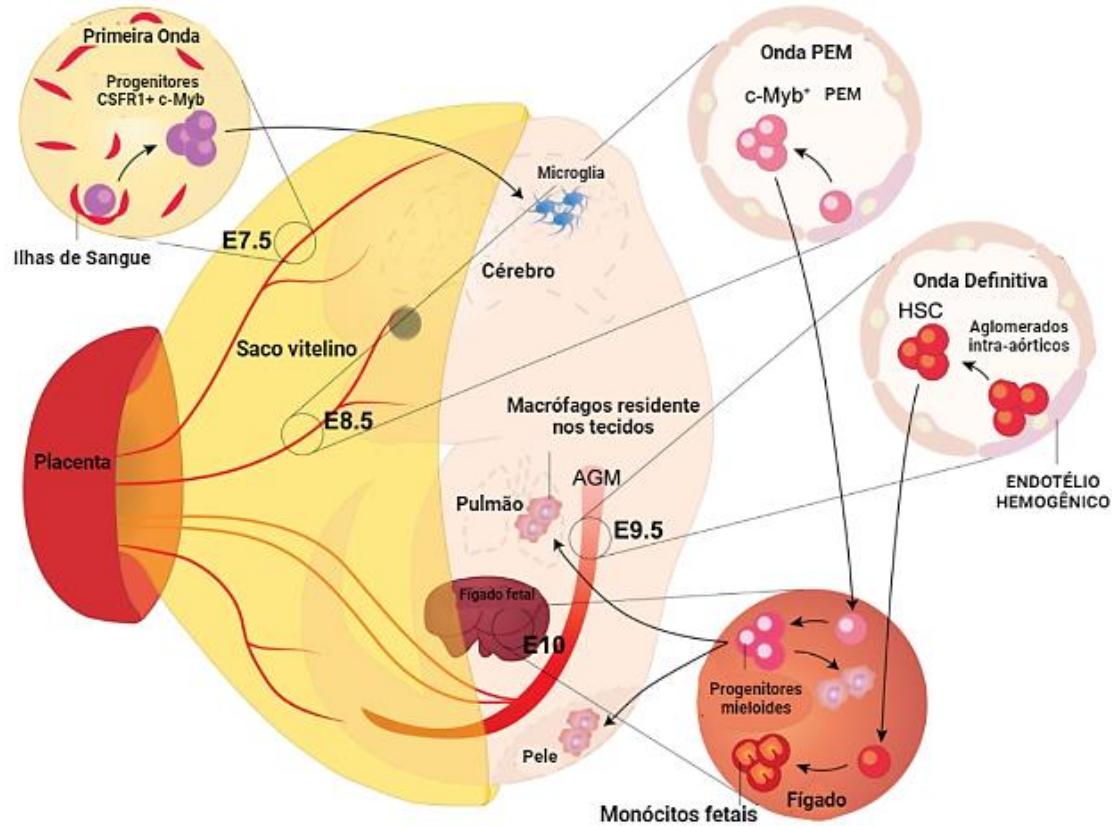


Figura 2. Ontogenia do macrófago tecidual. Os macrófagos surgem no embrião em 3 etapas diferentes conhecido como “ondas”. A primeira onda surge no saco vitelino que dá origem a macrófagos na microglia, seguido da segunda onda que migram para o fígado fetal ou se diferenciam localmente em macrófagos do saco vitelino. A última onda é de origem hematopoética que segue para o baço e a medula óssea. Adaptado e traduzido de: Wu; Hirschi, 2021.

2.2 MACRÓFAGOS

Macrófagos são células heterogêneas com papéis fundamentais na resposta inflamatória e na homeostase dos tecidos. Os macrófagos que residem nos tecidos (*RTM's*) adquirem características daquele microambiente e atuam no equilíbrio fisiológico e reparação do órgão (Park et al., 2022) (Figura 3).

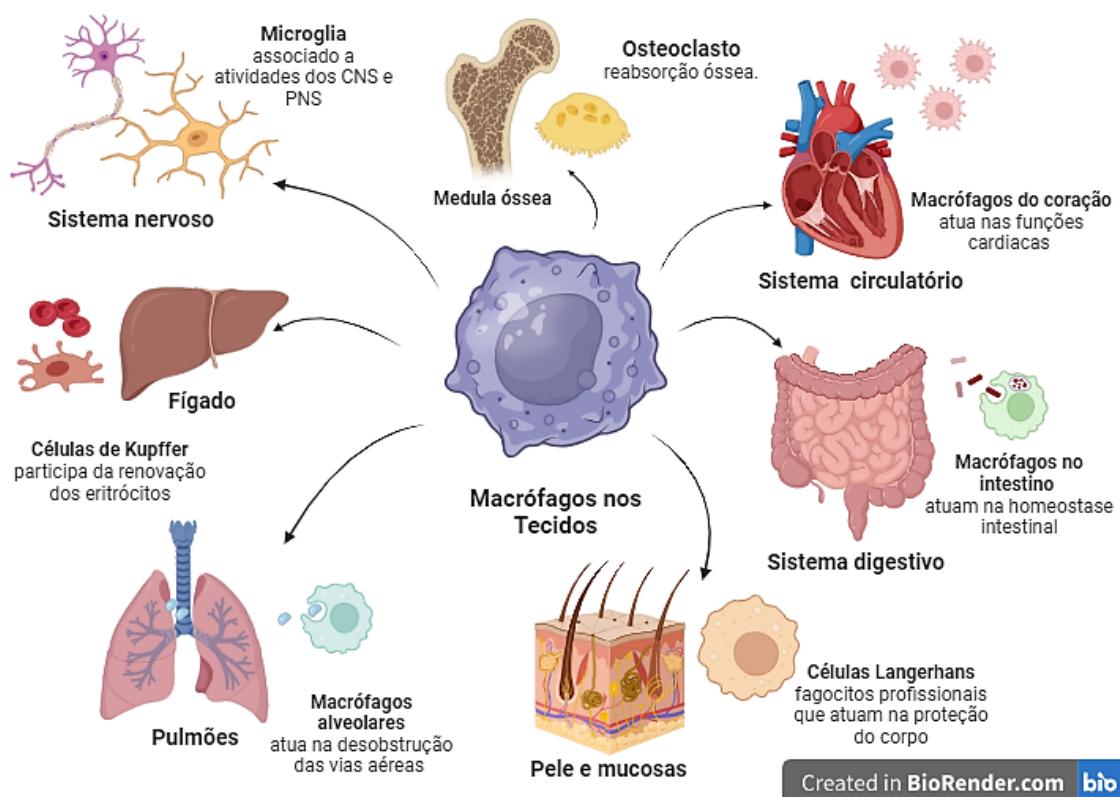


Figura 3. Macrófagos nos tecidos e algumas das suas atuações. Os macrófagos que compõe os órgãos são células e que participam de diversos processos metabólicos associados ao mesmo e apresentam diferenças entre si. Adaptado de: Mass et al., 2023; Park et al., 2022.

No trabalho de Dick e colaboradores (2022), eles analisaram a população de macrófagos nos tecidos e identificaram 3 populações que apesar de possuírem diferentes padrões de transcrição de genes associados ao órgão de origem, possuem características que delimitam as subpopulações provindas tanto da população embrionária quanto derivada de monócitos. A população denominada pelo autor TLF^+ (expressam os genes

TIMD4^+ , LYVE1^+ , FOLR2^+) são macrófagos do embrião que se estabelecem nos tecidos e se mantém por auto renovação e possui um perfil funcional associados com o transporte celular e endocitose nos órgãos. A população CCR2^+ (TIMD4^- , LYVE1^- e FOLR2^-) e MHC II^+ (TIMD4^- , LYVE1^- , FOLR2^- e CCR2^-) surgem após o nascimento. CCR2^+ é originária dos monócitos sendo constantemente reposto por eles nos tecidos e são células com perfil de células efetoras. Os monócitos também podem contribuir para a população MHC II^+ , porém ela possui sua capacidade de renovação limitada e sua função diferencia em cada órgão (Dick et al., 2022). Recentemente, foi observado que os progenitores comuns mieloides (*CMP*) dão origem aos progenitores comum monócitos-DC (*MDP*) diferente do que era estabelecido antes, com os *MDP* vindo dos progenitores de granulócitos-monócitos (*GMP*). *GMP*'s por sua vez se diferenciam em progenitores comum de monócitos (*cMoP*) e posteriormente em monócitos e macrófagos nos tecidos. *MDP* também podem dar origem a monócitos, mas não via *cMoP* (Liu et al., 2019).

Na manutenção do equilíbrio fisiológico, o macrófago desempenha o papel de ingestão de partículas extracelulares e as destruindo sendo essa sua função primordial também conhecida como fagocitose (Uribe-Querol; Rosales, 2020). O processo é iniciado através dos diferentes receptores extracelulares conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (*PPR*'s) que ao encontrarem seu ligante iniciam o processo de internalização e formação do fagolisossomo. Esses ligantes podem ser padrões associados a patógenos (*PAMP*'s), moléculas associadas a danos (*DAMP*'s) ou presentes em corpos apoptóticos como por exemplo o fosfolipídeo fosfatidilserina ou ainda se apresentar como opsoninas ligadas a antígenos como imunoglobulinas, e/ou moléculas do sistema complemento. Após sinalização, ocorre a reorganização dos filamentos de actina que permitem que a membrana da célula se desloque com seus pseudópodes ao redor do elemento a ser fagocitado criando uma cavidade côncava na área de ligação do receptor-ligante, cujas extremidades se encontram na porção final formando o fagossomo. O fagossomo vai se maturando conforme vai incorporando vesículas endossomais e se tornando ácido através do influxo de prótons H^+ , além de adquirir enzimas provindas de lisossomos e abrigar o complexo NADPH oxidase, que irá produzir espécies reativas de oxigênio (*ROS*). Essa estrutura microbicida e inóspita é agora denominada fagolisossomo (Lendeckel; Venz; Wolke, 2022; Uribe-Querol; Rosales, 2020).

Muitas células no corpo, após seu tempo de vida útil desempenhando seu papel celular fisiológico ou de defesa, são renovadas. Evento que ocorre desde a fase embrionária e permanece durante todo o nosso crescimento num processo denominado eferocitose. Esse evento ocorre de forma a não desencadear uma resposta inflamatória com o direcionamento feito pelas células alvos (sinais de “find-me” e “eat-me”) aos fagócitos para que cheguem até o local e reconheçam ligantes específicos presentes na sua superfície, o mais conhecido sendo a fosfatidilserina. A falha nessa via está associada a enfermidades como câncer, diabetes e obesidade. Esse processo, em que a célula sinaliza sua morte para ser fagocitada, pode ser desencadeado por micro-organismos para que possam estabelecer a infecção de forma silenciosa (Mehrotra; Ravichandran, 2022).

O reconhecimento de *PAMP*’s, *DAMP*’s e/ou citocinas, levam a produção de Óxido Nítrico (*NO*) sintetizados via transcrição da enzima óxido nítrico sintase (*iNOS* ou *iNOS2*) em uma reação oxidativa com L-arginina, oxigênio e NADPH. Enquanto o ROS superóxido (O_2^-) é formado pelo complexo de subunidades NADPH oxidase formado de multicomponentes presentes no citosol (p40, p47 e p67) e lisossomos (gp91 e gp22), que se acoplam no fagolisossomo para formar a enzima funcional. Os produtos das reações não são moléculas finais do processo sendo precursores para outros intermediários como H_2O_2 pela superóxido dismutase a partir do O_2^- . Ambos os mecanismos microbicidas *ROS* e *NO* são importantes mediadores da resposta pró-inflamatória para o controle de infecções. No entanto, esse consumo de oxigênio (explosão respiratória) para formar as moléculas que vão também ser liberados para fora da célula podem ser prejudiciais causando danos aos tecidos (Lendeckel; Venz; Wolke, 2022; Murphy, 2014, p. 76-82).

Os macrófagos podem se ligar a patógenos via *PPR*’s como por exemplo os receptores semelhantes a Toll (*TLR*’s), que interagem com seus respectivos *PAMP*’s. O contato com seu ligante pelos *TLR*’s fosforila e degrada *I κ B* que por sua vez está ligada ao complexo p50/p65 do fator de transcrição *NF κ B* no citoplasma. Esse evento permite a liberação do *NF κ B* e que esta molécula alcance o núcleo, onde é responsável pela transcrição de genes de citocinas. A ligação também irá induzir, como visto anteriormente, a fagocitose e a destruição dos micro-organismos intracelulares (Lendeckel; Venz; Wolke, 2022; Murphy, 2014, p. 76-99).

2.3 FENÓTIPOS

Os macrófagos presentes no microambiente não inflamatório dos órgãos estão envolvidos no metabolismo e compõe a organização do órgão residente. Uma vez que esse microambiente está em um cenário de inflamação ou infecção essas células podem adquirir um estado de ação efetora para eliminação do patógeno (M1) e posteriormente de restabelecimento da homeostase, contendo a exacerbação da resposta imunitária e levando a resolução da mesma no tecido danificado (M2) (Lendeckel; Venz; Wolke, 2022; Mass, 2018).

Os macrófagos expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*MHCs*) e atuam como células apresentadoras de抗ígenos. Eles reconhecem as moléculas pelos receptores de superfície e os internalizam enquanto a ativação dos TLR's auxilia na sinalização intracelular. As moléculas de MHC formadas no retículo endoplasmático encontram os fragmentos de peptídeos para apresentá-los aos linfócitos T. Enquanto MHC I⁺ apresentam peptídeos do citosol, MHC II⁺ apresentam peptídeos presentes nas vesículas. A partir disso se estabelece uma resposta抗ígeno-específica, com a interação MHC (I ou II) + Peptídeo/TCR/correceptor (CD8 ou CD4, respectivamente) que funcionam como primeiro sinal e ativação dos linfócitos T virgens, seguido do segundo sinal com a ligação da molécula co-estimulatória CD80/CD86 da célula apresentadora de抗ígeno com CD28 dos linfócitos T para expansão dos linfócitos. Linfócitos citotóxicos T CD8⁺, tem como função a morte das células infectadas ou tumorais. Linfócitos T CD4⁺ *helper* ativam outras células sendo chamados de auxiliares e se subdividem em diferentes perfis de células efetoras dependendo das citocinas presentes no local a qual vai ser estimulado (Murphy, 2014, p. 335-382).

As células T CD4⁺ auxiliares possuem subpopulações efetoras que vão orientar de forma diferente as suas células alvo. Os linfócitos Th1 são estimulados pelas citocinas IL-12 e INF- γ liberados pelos macrófagos que induzem a via transcricional de STAT4 e STAT1 respectivamente e vão atuar nos macrófagos que estejam apresentando seu抗ígeno específico amplificando sua ação microbicida contra patógenos intracelulares. Em paralelo, linfócitos Th1 também atuam induzindo a formação de novas células fagocíticas e o recrutamento delas para o sítio de infecção. Enquanto linfócitos Th2 serão estimuladas pela produção de IL-4 via STAT 6 e GATA 3 e atuarão recrutando células como eosinófilos e mastócitos e induzindo a produção de anticorpos IgE pelas células plasmáticas em infecções parasitárias e em alergias (Murphy, 2014, p. 335-382; 429-448).

No ambiente inflamatório, se encontra diversos macrófagos em diferentes estágios de ativação. Sendo células capazes de perceber os estímulos ao seu redor e com um repertório genético que lhe confere diferentes características, o macrófago pode se apresentar em contrastes imunológicos inflamatório e anti-inflamatório. Os macrófagos M1 são células comprometidas com a defesa e eliminação do agente patogênico sendo induzidos pelo reconhecimento de *PAMP*'s como LPS ou citocinas como INF- γ e GM-CSF produzidas pelos linfócitos Th1. Os macrófagos M1 tem uma alta capacidade de fagocitose e apresentação de抗ígenos, produzem mais espécies reativas de nitrogênio (RNS) e ROS e citocinas TNF- α , IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-18 e IL-23 além de estimularem de forma generalizada cada vez mais uma resposta mediada por células com a participação dos linfócitos Th1 (**figura 4**). Essa ação, no entanto, não deve ser mantida por tempo indeterminado, pois seus produtos microbicidas também podem levar a destruição tecidual (Atri; Guerfali; Laouini, 2018; Murphy, 2014, p. 335-382, 429-448).

Por outro lado, os linfócitos Th2 podem liberar IL-10, IL-4 e TGF- β devido a infecções (parasitos, fungos, helmintos) que vão inibir a resposta Th1 e ativar os macrófagos de forma alternativa (**figura 4**). Outros estímulos podem vir de M-CSF, IL-13 e complexos imunes, além de debrís e células apoptóticas consequentes da resposta inflamatória. Os macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias, arginina, expressam receptores de manose (CD206) e iniciam o restabelecimento da homeostase e regeneração do tecido após eliminação do agente infeccioso. A população M2 pode ainda ser encontrada com derivações M2a, M2b, M2c e M2d (Atri; Guerfali; Laouini, 2018; Murphy, 2014, p. 335-382; Yunna et al., 2020).

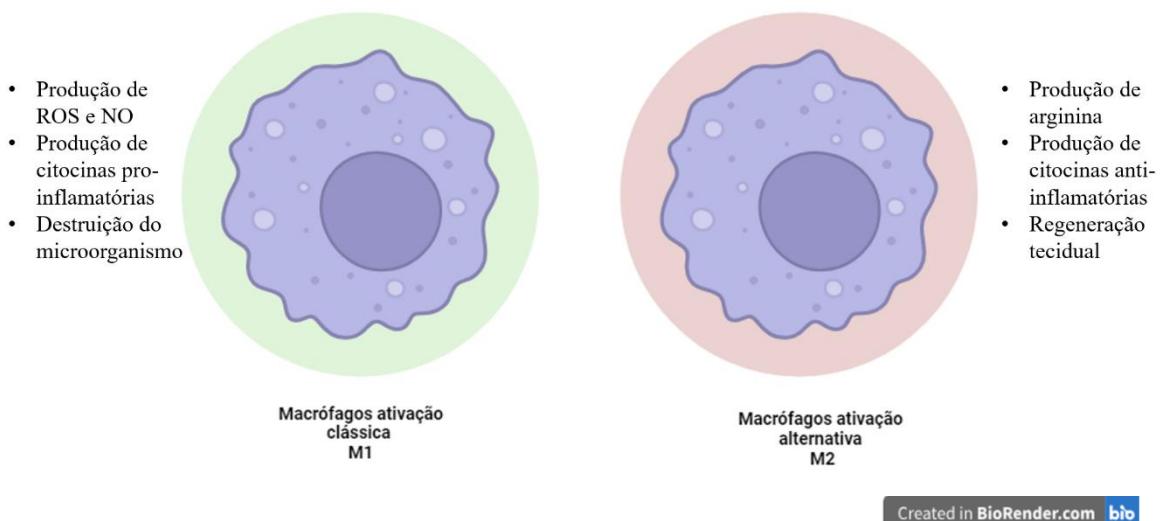


Figura 4. Fenótipos de Macrófagos. Macrófagos com ativação clássica (M1) são células efetoras e eficientes na eliminação de micro-organismos patogênicos. Macrófagos com ativação alternativa (M2) vão iniciar a reparação tecidual e retomar a homeostase.

A ausência desse equilíbrio é observada em doenças que podem destruir o tecido celular, na desarmonia homeostática do corpo ou na insistência da manutenção da inflamação. O estado inflamatório M1/M2, por exemplo, faz parte da regulação metabólica do tecido adiposo. O microambiente de tumores pode favorecer os macrófagos ali presentes a se diferenciar em M2. Consequentemente, essa ação supressora e restauradora diminui a ação citotóxica na célula tumoral colaborando com a sua disseminação e crescimento. A plasticidade do macrófago é explorada por micro-organismos para evitar a resposta inflamatória e se estabelecer no organismo. Da mesma forma que a ação dessas células pode também ser direcionada como uma opção de imunoterapia (Atri; Guerfali; Laouini, 2018; Yunna et al., 2020).

2.4 RELAÇÃO COM PARASITAS INTRACELULARES: *Leishmania spp.*

A leishmaniose compreende um grupo de manifestações clínicas ocasionada da infecção pelo parasita *Leishmania sp.* A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada com mais de 20 espécies de parasitos podendo infectar humanos e ocorrendo principalmente em regiões carentes do país de forma mais expressiva em regiões rurais, onde a combinação de ausência de medidas de saúde pública, desnutrição, condições precárias de habitação e circulação do vetor proporcionam condições ideais para a manutenção do ciclo do parasita (Alvar; Yactayo; Bern, 2006; WHO, 2023; WHO, [2023]; CDC, 2023).

A OMS (*WHO*) acompanha os casos de leishmaniose ao redor do mundo e estima-se que ocorram entre 50.000 a 90.000 de casos leishmaniose visceral e 600.00 a 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea anualmente. O Brasil é um dos países mais endêmicos para ambas as formas de leishmaniose ocorrendo em 2021 mais de 1.000 e 5.000 casos respectivamente. Porém, a pandemia de COVID-19 direcionou o sistema de saúde para a contenção da doença durante os últimos 5 anos e ainda é preciso saber o impacto da doença em outras enfermidades (“Global leishmaniasis surveillance: 2021, assessing the impact of the COVID-19 pandemic”; 2022).

O parasita possui um hospedeiro vertebrado e invertebrado no seu ciclo biológico e em cada um é possível encontrar o parasita com morfologias distintas (**Figura 5**). Os flebotomíneos são hospedeiros invertebrados e vetores da doença. Os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* são os principais relacionados a transmissão de diferentes espécies de *Leishmania sp.* no Velho mundo e Novo mundo respectivamente (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022). Esses insetos se alimentam de açúcar, mas as fêmeas fecundadas necessitam de sangue para nutrir os ovos e o obtem de humanos e outros animais em ambientes externos, domésticos ou ao redor do domicílio (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022). Para se alimentarem, elas rompem os capilares e vasos sanguíneos e os componentes da saliva vão inibir a coagulação no local da picada formando “piscinas de sangue”. Dentro do vetor, o parasita na sua forma promastigota transpassa a matrix peritrófica que reveste o sangue ingerido para alcançar o epitélio intestinal (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022; Serafim et al., 2021). O intestino do hospedeiro invertebrado abriga formas promastigotas do subgênero (*L*) *Viannia* na

região do intestino posterior e do subgênero (*L*) *Leishmania* no intestino anterior e médio (Lainson; Shaw, 1987). Ele alcança a probóscide do inseto e coloniza a região. O parasito consegue sobreviver ao sistema imune do inseto e sua presença altera a microbiota natural desses animais. Durante essa trajetória, o parasito passa por processos de diferenciação e multiplicação (metaciclogênese) que são novamente iniciados a cada nova alimentação tendo impacto na sua infectividade (Serafim et al., 2021). A fêmea ao se alimentar de um novo hospedeiro gera uma resposta imunitária no sítio de inoculação regurgitando componentes do flebotomíneo como a saliva junto das formas promastigotas metacíclicas e o PSG (gel secretório de promastigota) que irão favorecer a disseminação do parasito (Cecílio; Cordeiro-da-Silva; Oliveira, 2022; Serafim et al., 2021) .

A infecção de outros animais por *Leishmania* sp. torna a doença zoonótica com animais selvagens, de fazenda e domésticos sendo fontes de alimentação do flebótomo. O cão é o que tem maior impacto na disseminação da doença por serem animais de companhia e os que vivem nas ruas acabam viajando por diferentes locais. Metade da população regional desses animais podem se infectar com a espécie *L. infantum* causadora da leishmaniose canina ou ainda albergarem outras espécies. Gatos também podem se infectar, mas com uma resistência maior ao parasito a menos que o animal apresente alguma doença que reduza sua imunidade (ex: FIV) possibilitando o surgimento dos sintomas, o que acaba levando a um menor número de casos. Os cães infectados podem tanto apresentar um quadro clínico severo iniciando com nódulos e ulcerações e com o tempo desenvolvendo sintomas sistêmicos ou serem assintomáticos. Esses extremos estão relacionados com a competência do sistema imunológico do animal em combater o parasito (Montaner-Angoiti; Llobat, 2023; Sykes, Baneth, Petersen, 2013). No Brasil, em 2016 em nota técnica com o Ministério da Saúde (MS), o Ministério de Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou o registro do Milteforan™ pela empresa Virbac Saúde Animal, o único aprovado para uso. O tratamento da leishmaniose visceral canina é realizado seguindo instruções do fabricante com acompanhamento do Médico Veterinário, sendo uma escolha individual do tutor (MAPA, 2016). O controle do reservatório é uma das estratégias de controle dos casos humanos. Nessa linha, a eutanásia do animal acaba sendo aplicada principalmente no Brasil, mas essa prática tem enfrentado muita discussão sobre o seu real impacto positivo no número de casos humanos. Outros métodos consistem em coleiras com inseticidas e vacinação dos animais (Montaner-Angoiti; Llobat, 2023; Sykes, Baneth, Petersen, 2013).

No local de inoculação, a presença do parasito vai desencadear uma resposta imunológica com a participação do sistema complemento, monócitos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas, queratinócitos, células de Langerhan, natural killers, linfócitos e macrófagos que são seus hospedeiros principais (Costa-da-Silva et al., 2022). No hospedeiro vertebrado, o sistema imunológico tenta eliminar o patógeno, enquanto o parasito dispõe de mecanismo de escape para sobreviver e se manter no hospedeiro. A infecção leva ao desenvolvimento dos sintomas que compõe os diferentes quadros clínicos (Conceição-Silva; Morgado, 2019).

Dentro dos macrófagos, os parasitos se transformam em formas amastigotas no ambiente ácido do vacúolo parasitóforo e se multiplicam ativamente até romper e atingirem o meio extracelular onde irão novamente infectar outras células e manter assim a infecção (Sasidharan; Saudagar, 2021). As pesquisas sobre leishmaniose têm o macrófago como peça focal sendo ela a célula hospedeira, e sendo importante também para a destruição do parasito (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

Macrófagos reconhecem os componentes *LPG* (Lipofosfoglicano) e *Gp63* (glicoproteína 63) presentes nas formas promastigotas dos parasitos e de alguns parasitos que sofreram ação do sistema complemento via ligação aos seus receptores PRR's (CR3, CR1, Fc γ R, DC-SIGN, receptor de fibronectina e de manose) que conjuntamente promovem sua fagocitose. A entrada via receptor CR3 é considerada uma via silenciosa do patógeno uma vez que a ativação diretamente pelo parasito ou por porções iC3b inibe uma possível resposta inflamatória (Ueno; Wilson, 2012).

A participação dos TLRs pode ser ambígua na infecção por *Leishmania sp*. Os estudos focados nos TLR-2, 4, 9 e 3 divergem sobre qual TLR, em qual modelo de infecção, com qual espécie utilizada e em qual célula o papel dos TLR's são importantes para o estabelecimento ou não da doença. No entanto, há evidências de que LPG seja reconhecido por TLR2, de que o complexo proteoglicerolipídio (P8) de amastigotas seja reconhecido por TLR4 e de que o DNA do parasita seja reconhecido por TLR9 e que a infecção por *Leishmania sp*. pode modular a expressão desses receptores. Outros estudos ainda indicam que a ativação da sinalização de TLR através de imunização pode levar a uma proteção contra o parasito (Faria; Reis; Lima, 2012)

A sobrevivência do parasito dentro da célula é possibilitada pelo desequilíbrio no mecanismo de formação do fagolisossomo. Para evitar a formação do vacúolo

parasitóforo, o parasito dificulta a chegada de enzimas do lisossomo e de vesículas do endossomo além de alterar sua característica microbicida para evitar sua degradação e conseguir se diferenciar em amastigotas (Martínez-López et al., 2018).

NO e *ROS* são componentes fundamentais na formação da resposta contra a leishmaniose em particular seus derivados tóxicos ONOO^- (Peroxinitrito) e H_2O_2 . O parasito por sua vez age em várias vertentes para sobreviver a ação microbicida, seja impedindo a formação e estímulo enzimático de NADPH oxidase e iNOS ou com suas próprias enzimas como tripanotiona redutase, triparedoxina, peroxiredoxina entre outras para produção de antioxidantes (Van Assche et al., 2011). Na via de formação de NO encontra-se o substrato L-arginina. Esse substrato garante a sobrevivência do parasito sendo adquirido via próprio transportador de L-arginina extracelular e submetido a atividade de enzimas metabólicas. Sendo vias opostas, a ativação do macrófago define a formação de NO (M1) ou poliaminas (M2). Consequentemente, na infecção por *Leishmania sp.* o perfil imunológico do macrófago está diretamente relacionado a destruição ou multiplicação do parasito (Wanasen; Soong, 2008).

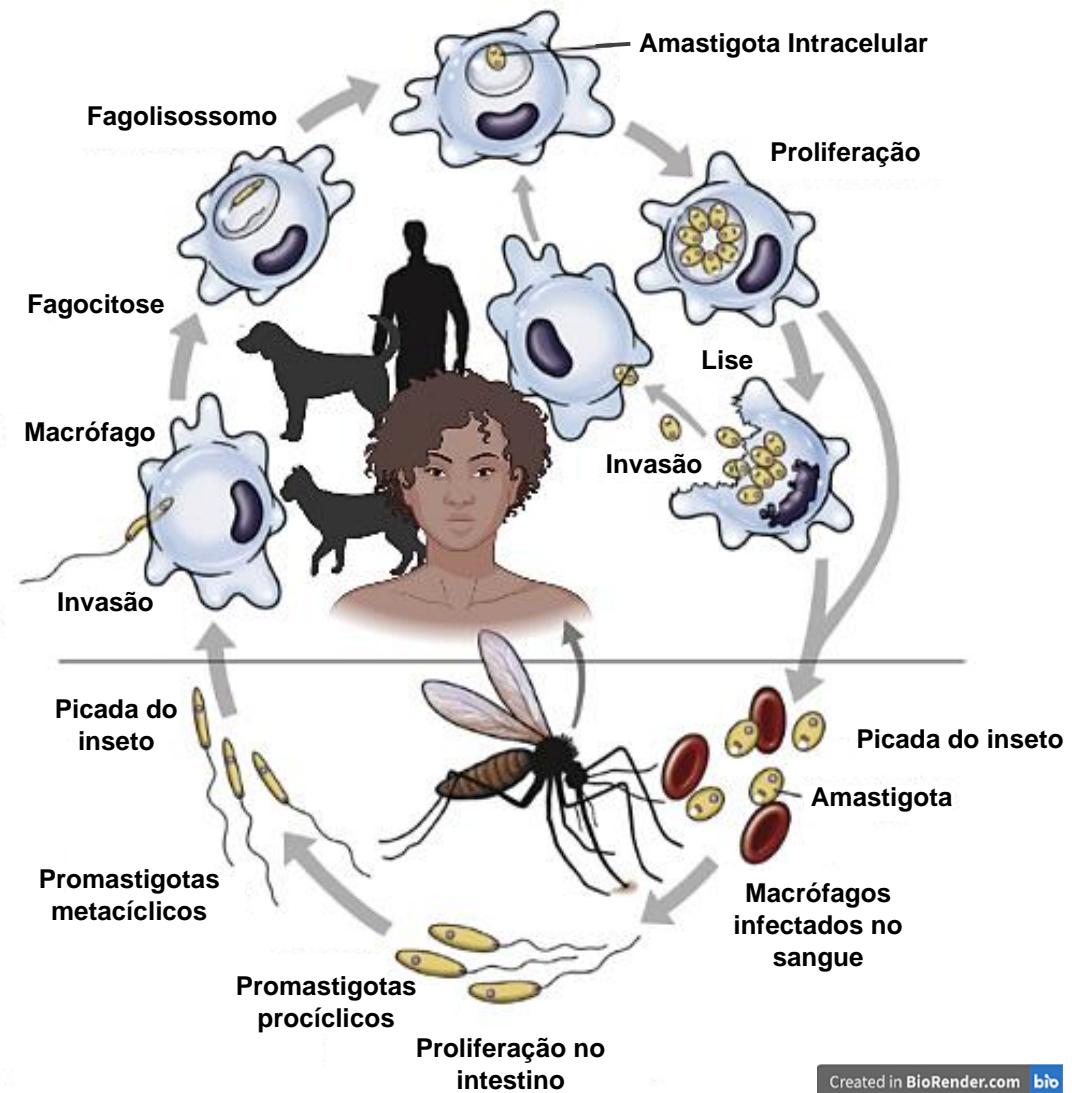


Figura 5. Ciclo Biológico da *Leishmania* sp. Durante a alimentação sanguínea, o flebotomíneo fêmea injeta formas promastigotas metacíclicas que irão infectar os macrófagos dos hospedeiros mamíferos. Nessas células, os parasitos na forma amastigota se multiplicam rompendo a célula e infectando outras ao redor. Numa nova alimentação o flebotomíneo irá ingerir formas amastigotas dando continuidade ao ciclo. Adaptado de: Sykes, Baneth, Petersen, 2013.

A reação mais comum a infecção por *Leishmania sp.* se iniciam com pápulas, que formam nódulos e depois ulceram no local da picada, conhecido como leishmaniose cutânea (LC) que costumam ser indolores e fechar entre 3-18 meses. As espécies envolvidas são *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guayanensis*. Alguns casos, até 10% dos pacientes, podem evoluir para formas mais agressivas dependendo da espécie infectada. Leishmaniose cutânea difusa é resultado de uma ausência de resposta imune com lesões que permanecem como pápulas e nódulos enquanto a leishmaniose disseminada pode se manifestar com diferentes tipos de lesões. Em ambos os casos, o paciente apresenta múltiplas lesões em diferentes locais do corpo. Mucocutânea em oposição a difusa é consequência da resposta imune exacerbada onde o paciente perde o tecido da pele e sofre deformação na região nasofaringe com tratamento pela vida toda (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Na leishmaniose visceral (LV) os humanos são reservatórios da espécie *L. donovani* e *L. infantum* e os cães da *L. infantum* (*L. infantum chagasi*). Os sintomas mais distintivos são o aumento do baço e do fígado. É a forma mais fatal da doença se não tratada em até 2 anos e infelizmente pode ser associada com infecção com HIV, complicando ainda mais o quadro clínico (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Pacientes com LV infectados com a espécie *L. donovani* podem desenvolver a forma cutânea post-kala-azar. O tratamento para leishmaniose não leva a eliminação completa do parasito e por isso alguns ainda podem permanecer na pele o que faz o paciente reincidir. O indivíduo possui respostas imunológicas diferentes ocorrendo localmente na lesão (Th2) e no organismo (Th1) (Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Os tratamentos são em sua maioria drogas injetáveis localmente na picada ou intravenosa. Os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio (com nome comercial de Glucantime e Pentostam respectivamente) são os tratamentos mais antigos sendo metabolizados dentro do macrófago em compostos leishmanicidas trivalentes. Como foi por muito tempo uma monoterapia, o surgimento de parasitas resistentes ao tratamento antimonial foi inevitável. A diamidina pentamidina foi uma alternativa em casos de resistência aos antimoniais. Assim como o antifúngico anfotericina B, usado na leishmaniose devido a ambos os organismos possuírem o ergosterol na camada lipídica celular que é alvo do fármaco. Paramomicina é outro medicamento descoberto com mecanismo de ação não direcionado a leishmaniose (antibiótico) mas que se provou eficaz usado no tratamento. Em busca de fármacos com

via de administração mais eficientes, a miltefosina foi aprovado recentemente para uso oral para compor o quadro medicamentoso na Índia (Sasidharan; Saudagar, 2021). No ano de 2018, foi tornado público pelo Ministério da Saúde (MS) a decisão de incorporar a miltefosina ao Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil para o tratamento de leishmaniose tegumentar (MS, 2018). Os medicamentos enfrentam grandes problemas de efeitos adversos graves que dificultam a continuação do tratamento pelo paciente e isso acaba colaborando para o surgimento de cepas resistentes (Sasidharan; Saudagar, 2021). Estratégias usadas como alternativas a esse entrave são a terapia com combinação de fármacos e reformulações como a anfotericina B na sua forma lipossomal, mas sua implementação na rotina de tratamento exige um investimento muito superior aos demais fármacos. A combinação infelizmente por muitas das vezes também não acaba tendo sucesso (Carvalho et al., 2021; Sasidharan; Saudagar, 2021).

Como dito anteriormente, macrófagos são peça chave e o que se observa muito bem caracterizado na infecção por *L. major*, é de que o direcionamento imunológico do macrófago M0 para M1 logo no início do processo infeccioso possibilita que essa célula fagocite, destrua e ative a resposta adaptativa para a eliminação do parasito. Por outro lado, a constante produção de radicais oxidativos e citocinas inflamatórias leva a lesão tecidual que não necessariamente está relacionado a diminuição da parasitemia. Apesar da polarização M2 ser um fator de favorecimento do estabelecimento do parasito, que o mesmo explora para conseguir se manter no hospedeiro, ela é necessária para garantir o controle da intensidade dessa resposta inflamatória. O que ocorre, no entanto, é a predominância de uma resposta mediadora que suprime uma ação efetora contra o parasito (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

2.5 CULTIVOS CELULARES COMO FERRAMENTA PARA ESTUDOS BIOLÓGICOS

Cultura de células de animais surgiram na virada do século XIX para o século XX. Em 1907, Ross Granville Harrison foi o mais bem sucedido na técnica ao manter fibras nervosas embrionárias de rã e posteriormente Carrel em 1912 desenvolveu um modelo de células cardíacas a partir de embrião de galinha. O objetivo inicial era avaliar o comportamento celular livre de variações do ambiente que o organismo completo possui e dessa forma eliminar o efeito de possíveis variáveis no estudo (Landeker, 2002 apud Jedrzejczak-Silicka, 2017; Dove, 2012 apud Jedrzejczak-Silicka, 2017).

No começo, fluidos animais eram utilizados como meio de cultura, mas isso apresentava desafios já que os nutrientes e fatores de crescimento presentes nesses fluidos eram difíceis de controlar e medir precisamente. Com o tempo, os pesquisadores começaram a desenvolver meios de cultura mais definidos e específicos, contendo uma mistura precisa de nutrientes, sais, fatores de crescimento e, em alguns casos, soros ou extratos que estimulavam o crescimento das células (Jedrzejczak-Silicka, 2017).

O isolamento de fragmentos de tecidos animais e a sua manutenção em meios de cultura, foi uma das abordagens iniciais para cultivar células. A ideia era fornecer às células nutrientes e condições adequadas para que elas continuassem a se dividir e crescer em um ambiente controlado (Freshney, 2011).

Um marco importante foi a criação de linhagens celulares primárias e permanentes. Linhagens primárias são compostas por células retiradas diretamente de um tecido animal e mantidas em cultura por um tempo limitado. Elas possuem uma vida útil curta com poucas divisões celulares antes de atingirem um estágio de senescência e não poderem mais se dividir. Já as linhagens celulares permanentes são células que adquiriram a capacidade de se dividir indefinidamente, muitas vezes através de modificações genéticas ou seleção em culturas especiais. Essas técnicas de cultura de células tornaram-se vitais para várias áreas da pesquisa, incluindo estudos sobre genética, câncer, resposta imunológica, desenvolvimento de vacinas, testes de drogas e muito mais. Elas também foram usadas para desenvolver modelos de doenças e estudar o efeito de agentes externos sobre as células (Freshney, 2011; Jedrzejczak-Silicka, 2017).

A primeira linhagem celular humana foi isolada de uma paciente negra com câncer cervical chamada Henrietta Lacks. As células HeLa foram isoladas durante uma de suas visitas ao hospital John Hopkins na década de 50. As células de Henrietta de alguma forma, mas muito provável pela sua característica cancerígena, conseguiram se manter e se multiplicar por anos fora de seu corpo levando-a a ser distribuída e utilizada por cientistas e pesquisadores ao redor do mundo. Ela participou de diversos projetos e estudos científicos após sua morte, sem que sua família soubesse sobre ou que detivesse algum direito financeiro. Numa época vergonhosamente discriminatória, Henrietta sofreu uma violência que mais tarde abriu portas sobre ética hospitalar e científica. Hoje sua família detém seus direitos e são participantes ativos na luta de políticas e regramentos acerca de uso de material biológico humano em pesquisas. A linhagem celular HeLa foi importante para o desenvolvimento de várias áreas como vacinas, remédios e no avanço de estudos de doenças até atualmente com o desenvolvimento da vacina para COVID-19, sendo uma peça fundamental na trajetória da humanidade tornando Henrietta imortal (“Henrietta Lacks: science must right a historical wrong”, 2020; Skloot, 2011).

O uso de linhagens permitiu o conhecimento na área da dinâmica de processos fisiológicos e metabólicos, estrutura, ciclo, desenvolvimento e fenótipo celular e informações do material genômico e proteômico com manipulação gênica (Freshney, 2011). À medida que crescia a demanda, a disponibilidade aumentava com a introdução de novas linhagens de várias partes do corpo, meios de cultivo e suplementos e com técnicas mais avançadas de controle de contaminação. Os estudos progrediram no campo da imunologia, oncologia, vacinas, fertilização, farmacologia, transplantes entre outros sendo até aplicada na purificação de produtos biológicos com fins comerciais (**Figura 6**) (Freshney, 2011).

APLICAÇÕES DO CULTIVO CELULAR

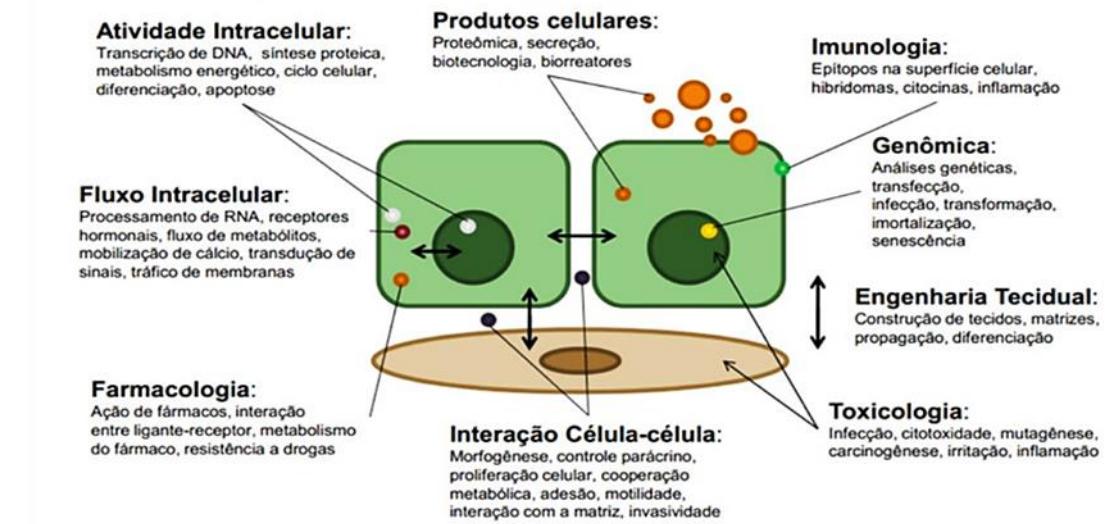


Figura 6. Aplicações do cultivo celular. O estabelecimento de linhagens celulares permitiu o desenvolvimento de diversas áreas favorecendo o avanço das pesquisas científicas. Adaptado e traduzido de: Freshney, 2011.

Linhagens celulares são opções de modelos para pesquisa na ciência em diversos estudos que precedem o uso de animais, em particular para seleção de compostos químicos para produção de fármacos. São alternativas com maior facilidade de obtenção (compra comercial), com crescimento controlado devido ao ambiente estável (disponibilidade de oxigênio, pressão osmótica, tensão do gás carbônico, temperatura e pH) e suprimento fisiológico constante (meio de cultura, soro, suplementos) podendo ser armazenado em nitrogênio líquido. Permite uma melhor reprodutibilidade já que as culturas tendem a crescer de forma mais consistente e regular que permite uma melhor visualização das variações do estudo com determinado número de reproduções. São muito comumente usadas em estudos farmacológicos por permitir a avaliação de doses, concentrações e tempo de tratamento. Outra vantagem é a de que a maioria das culturas celulares são bem caracterizadas em relação a marcadores extracelulares e intracelulares. Em fases ainda introdutórias de estudos tem um custo-benefício favorável em relação a uso de reagentes e tempo experimental com a manutenção de poucas culturas (Breslin; O'driscoll, 2013; Freshney, 2011).

A linhagem celular RAW 264.7 são monócitos-macrófagos peritoneais murinos transformados a partir do vírus A-MuLV (*Abelson Leukemia vírus*) (Raschke et al., 1978). Em cultura, macrófagos RAW 264.7 possuem citoplasma pouco expandido após aderidos tendo formato redondo e dobrando seu número celular em aproximadamente 11h (Chamberlain et al., 2009; Sakagami et al., 2009). Essas células são modelos mais próximos de macrófagos de medula óssea e são amplamente usados na pesquisa em estudos labororiais. Possuem uma alta expressão de CD11b e c, CD54, F4/80, CD18, FcR, CD14 e MHC I enquanto MHC II e CD40 são pouco expressos (Berghaus et al., 2010; Chamberlain et al., 2009). Essas células estimuladas com LPS se tornam multinucleadas e aumentam sua capacidade fagocítica, além de produzir TNF- α e quimiocina CCL5 resultado da ativação de TRIF e MyD88 (Berghaus et al., 2010; Chamberlain et al., 2009; Nakanishi-Matsui et al., 2012). É possível observar a expressão de citocinas IL-12, IL-10 e em menor concentração TGF- β após estímulo com LPS com consequente aumento de ROS e NO e molécula co-estimulatória CD86. Essa célula apresenta baixa produção de arginase (Nadaes et al., 2020). Assim como elas expressam mRNA para TGF- β também expressam para IL-1 β , IL-6 e GM-CSF, porém não foi possível observar a tradução em proteínas, somente para MCP-1 além de responderem a Pam3CSK4 e poly I:C, o que sugere uma ativação via TLR2 e TLR3 respectivamente. No entanto, a expressão do receptor TLR4 nessas células é baixa (Berghaus et al., 2010; Chamberlain et al., 2009).

A DH82 é uma linhagem celular tumoral histiocitária de medula óssea do fêmur originária de um Golden Retriever 10 anos (Wellman et al., 1988). São culturas de macrófagos-monócitos com morfologia heterogênea e crescimento em monocamadas que duplicam o seu número celular em 26h. Culturas mais jovens tendem a conter células arredondadas com projeções citoplasmáticas curtas e numerosas, já culturas velhas mostram células mais achatadas com maior superfície celular e projeções grandes e largas além de perderem seu potencial de aderência (Heinrich et al., 2015; Maeda et al., 2016; Wellman et al., 1988). Essas células expressam Fc γ , CD11c, CD11b, CD5, CD18, CD44, CD45, MHC I, MHC II (em baixos níveis), ICAM-1, CD14, CD80 e CD86 mais conforme o número de passagens tende a diminuir CD11c, CD14, CD18, CD45 e CD80 (Barnes et al., 2000; Heinrich et al., 2015; Wasserman et al., 2012; Wellman et al., 1988). Também foi identificado a expressão de TLR4 nessas células (Fujimoto et al., 2012). Wasserman e colaboradores (2012) sugerem que essas células se assemelham a células dendríticas

derivadas de medula. No perfil de citocinas expressas a nível mRNA foram encontrados TNF- α , IL-6, IL-1, IL-5, IL-8, IL-10 e IL-12. Curiosamente, as citocinas IL-6 e TNF- α são secretadas por células sem estímulo em níveis semelhantes ao de monócitos caninos estimulados com 20 μ g/mL de LPS (Barnes et al., 2000; Grone et al., 1999; Wellman et al., 1988). Esses níveis são aumentados quando DH82 é cultivada com 20 μ g/mL de LPS. Ambos os estudos não foram capazes de detectar a presença de IL-1 no sobrenadante das culturas de DH82 após indução com LPS. DH82 apresenta propriedades de macrófagos M2 com baixa expressão de CD86, MHC II, IL-12, IL-10 e TGF- β e produção de NO e ROS em comparação a RAW 264.7. Por outro lado, essas células apresentam uma alta atividade de arginase em repouso (Nadaes et al., 2020).

A linhagem celular P388D1 é provinda de células ascíticas isoladas de camundongos DBA/2 que desenvolveram um linfoma após tratamento com metilcolantreno (Koren et al., 1975). Os isolados deram origem a linhagem celular linfoide P388 e a linhagem celular de macrófagos P388D1. A linhagem celular P388D1 são macrófagos que se acredita serem derivados de precursores em comum com linfócitos B por expressar marcadores de ambos os tipos celulares. Ambas as linhagens expressam diversos抗ígenos em comum dentre eles Ly-24 (de precursores mieloides, linfócitos B e linhagens hematopoiéticas), Lyb-2 e o抗ígeno reconhecido pelo anticorpo 6C3 (hoje sendo conhecido por BP-1 ou Ly-51) de linfócitos B e o receptor FcR mas somente P388D1 expressa também MAC-1 e MAC-2 e não expressa Ly-1 como a linhagem celular linfoide (Bauer et al., 1986). Uma característica interessante dessa linhagem celular é de que pode crescer aderida secretando IL1, associada a beads ou permanentemente em suspensão sem secretar a citocina (Prestidge et al., 1981). Ensaios de fagocitose demonstram que as células conseguem internalizar eritrócitos marcados com Ig via receptor FcR e CR3 (Bouvier et al., 1994). Já foi observado também que essas células expressam CD44 e P2X7R (Lin et al., 2012; Ren et al., 2010). Na presença de LPS ou LPS+ INF- γ essas células produzem NO, TNF- α , IL-27, IL-6, IL-17A, GM-CSF e IL12p70, IL-23 e IL-1 α (Śmiałek et al., 2022). Com PMA, as células aumentaram sua expressão de receptores TLR2, TLR4, TLR9, NOD1, NOD2 e moléculas MHC I e II podendo observar também a produção de citocinas IL-1 β , IL-12, TNF α , IL-4 e IL-10 além de NO (Weber et al., 2023).

2.6 PRODUTOS NATURAIS

Na natureza encontramos inúmeras substâncias provindos de plantas, animais e até micro-organismos que possuem propriedades farmacológicas diversas, além de poderem ser matéria prima para manipulação sintética de outros produtos que possam gerar possíveis medicamentos (Ekiert; Szopa, 2020). Produtos naturais, também denominados metabólitos secundários, foram amplamente explorados durante 1990 a 2000 e isso é demonstrado ao longo dos anos com inúmeros fármacos aprovados tendo origem em produtos naturais (mais de 60% desde 1981) para tratamentos de diferentes enfermidades. O que demonstra que não há como deixar de investir efetivamente nessa área (David; Wolfender; Dias, 2015; Newman; Cragg, 2020). De exemplos pode se citar o antimalárico artemisinina, os antineoplásicos antraciclinas, dolastatinas e taxol e o anti-hipertensivo captopril obtidos de compostos bioativos (Newman, 2022). Nessa linha, nosso País com sua rica biodiversidade é uma fonte abundante de produtos naturais que deve ser preservada, uma vez que seu desaparecimento gera impacto no descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos (David; Wolfender; Dias, 2015; Newman; Cragg, 2020).

As plantas medicinais de uso tradicional são um conhecimento ancestral e cultural que faz parte de diversas populações. Estudos científicos visam analisar essas e outras plantas em busca de suas propriedades terapêuticas e sua segurança, além de tentar isolar seus componentes químicos com a mesma finalidade. A obtenção desses produtos pode ser em forma de óleos essenciais ou de extratos de diversas partes da planta. Essas misturas são complexas e a concentração da molécula ou a presença dos componentes podem ser influenciados por diversos fatores tal como variações climáticas (Ramsey et al., 2020). As inúmeras substâncias químicas que formam os produtos naturais podem atuar de forma sinérgica para a ação farmacológica. Ao passo que a atividade biológica também pode ser devido a um componente isoladamente podendo ele estar presente de forma majoritária ou não (Ekiert; Szopa, 2020).

Sendo assim, estudos com produtos naturais abrem portas para o surgimento de novos compostos bioativos que permitem a criação de fármacos mais eficientes, além de permitir a inovação de formulações já estabelecidas na indústria farmacêutica com a associação de moléculas.

2.6.1 (-)-GUAIOL

O (-)-Guaiol é um dos compostos sesquiterpeno de fórmula química C₁₅H₂₆O presentes no óleo obtido da *Aloysia gratissima* (*Verbena gratíssima* Gill. et Hook, *Aloysia lycioides* Cham., and *Lippia lycioides* (Cham.) Steudel), uma planta vicejante encontrada em abundância no continente americano (**Figura 7**). “Lavanda-do brasil,” “erva-de-nossa-senhora,” “erva sagrada,” e “garupa” são alguns dos nomes comuns dessa erva no Brasil e a composição de seus óleos é rica em sesquiterpenos como o (-)-Guaiol durante as colheitas provindas do verão e outono sendo encontrado nas folhas e frutos da planta. Popularmente no Brasil, utiliza-se da planta para dores de cabeça, problemas no sistema respiratório, nervoso e digestório, sedativo e antidepressivo e alguns dos benefícios são comprovados cientificamente com descobertas de ação microbicida, antifúngica, antiviral, anti-inflamatório e antioxidante dos quais muitas das vezes são associados ao (-)-Guaiol com ele sendo considerado o componente ativo (Alijar Souza et al., 2022).

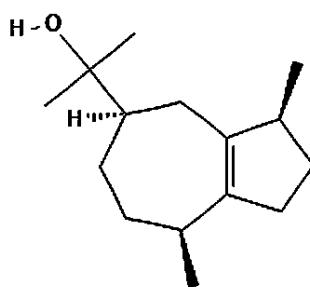


Figura 7. Estrutura química do (-)-Guaiol. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Yang e colaboradores (2016) demonstraram que o (-)-Guaiol apresenta atividade antineoplásica em células cancerígenas de pulmão atuando na enzima RAD51 responsável por reparar as fitas de DNA e induzindo a degradação do material genético via ativação do processo de autofagia. Posteriormente, esse grupo constatou que a indução da autofagia nas células tratadas com (-)-Guaiol era pelo bloqueio da via mTOR que inibe o ciclo celular apresentando um potencial maior do que o fármaco controle rapamicina já que, atua tanto no complexo mTOR 1 (mTORC1) quanto no mTOR 2 (mTORC2)

(Yang et al., 2018). Esse bloqueio é depois corroborado por Zeng e colaboradores (2022) onde observaram que (-)-Guaiol inibe a via de sinalização PI3K/Akt em células de adenocarcinoma pulmonar. O tratamento de 24h com (-)-Guaiol em células de linhagem celular de câncer de pulmão A549 e H1299 levou a liberação de DAMP's como calreticulin (CRT), ATP, HMGB1 (*highmobility group box 1 protein*) e Hsp70/90 considerados sinais de “*find me*” e “*eat me*” que desencadeiam uma morte celular com atuação das APC's e linfócitos. O composto parece induzir a autofagia que consequente leva a apoptose das células. No mesmo estudo, em camundongos C57BL/6 o tratamento com (-)-Guaiol (8 mg/kg - 3x por semana) reduziu significativamente o tamanho do tumor subcutâneo induzido por essas linhagens a partir do 25º dia de monitoramento do desafio seguido da inoculação intraperitoneal do composto e não apresentou citotoxicidade nos animais (Yang et al., 2022).

Nosso grupo mostrou que o tratamento com o OE de *Aloysia gratíssima* em *L. amazonenses* *in vitro* foi tóxico para o parasita assim como o constituinte (-)-Guaiol que evidenciou um IC₅₀ de 0.01 µg mL⁻¹ [44.9 nM] para formas amastigotas. O tratamento com (-)-Guaiol não mostrou toxicidade para os macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c assim como não alterou sua capacidade fagocítica e nem alterou a produção de NO dessas células (Garcia et al., 2018). O pré-tratamento com o extrato dessa planta (10 mg/kg⁻¹), que também contém (-)-Guaiol, diminuiu o edema inflamatório provocado pelo polissacarídeo carragenina em patas de camundongos. O efeito é observado a partir da primeira hora após o desafio com o polissacarídeo carragenina. No entanto, após 2h o efeito diminui consideravelmente e nas análises de 4h não se observa diferença no tamanho do edema no controle em comparação com o tratado com (-)-Guaiol. No pico de tempo do efeito do tratamento (3h), observou-se uma diminuição na presença de mieloperoxidase na lesão (Souza et al., 2020).

O OE de *Calycorectes sellowianus* possui 13.1% de concentração de (-)-Guaiol na composição e o tratamento com 9 mg/mL do OE por 1h em leucócitos de ratos *Wistar*, diminuiu em 91% o recrutamento dessas células frente ao estímulo com plasma dos animais junto de LPS no modelo de ensaio *Boyden chamber* (Apel et al., 2010). Hong e colaboradores (2023) identificaram o (-)-Guaiol no extrato BP-95E-H2O-BuOH de casca de banana e observaram que o mesmo não se mostrava tóxico para células RAW 264.7 após 48h de tratamento e que células previamente tratadas com 100 µM por 1h com (-)-

Guaiol e depois estimuladas por mais 48h com LPS (100 ng/mL) tiveram inibição da produção de NO, IL-6 e TNF- α .

2.6.2 PIPERINA

A Piperina é um composto alcalóide sendo sua fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_3$ e é encontrado em espécies da família Piperaceae de cultivo tropical, essencialmente no gênero *Piper* (Figura 8). Na espécie *Piper nigrum*, cujos frutos secos são popularmente conhecidos como “pimenta do reino”, a concentração de piperina pode chegar a 7,4%. Suas propriedades farmacológicas incluem atividade antioxidante, antineoplásica, analgésica, anti-inflamatória, hepatoprotetora, imunomodulatória, antifúngica entre outras (Haq et al., 2021; Quijia; Araujo; Chorilli, 2021).

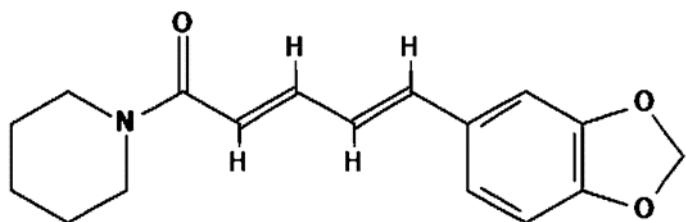


Figura 8. Estrutura química da Piperina (AF1). Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Uma característica interessante é sua biodisponibilidade. Suresh e Srinivasan (2007) demonstraram que 44-63% da sua concentração inicial é absorvida pela região mucosa do intestino de ratos albinos após 1 semana de alimentação. Piperina mantém sua estrutura química original após a absorção sendo possível identificar o composto no fluido seroso e no tecido do intestinal. O composto se liga a albumina presente no sangue o que permite sua distribuição no corpo (Suresh; Srinivasan, 2007; Suresh et al., 2007). Sua biodisponibilidade também está relacionada a sua interação com a membrana plasmática, alterando a dinâmica e fluidez do tecido intestinal e aumentando a captação de substâncias quando estas estão em associação com piperina (Feng et al., 2014; Khajuria; Thusu; Zutshi, 2002).

Jin e colaboradores (2018) exploram essa capacidade intensificadora de piperina ao associar o composto ao ativo Rh2 (Ginsenosídeo Rh2) derivado do ginseng, onde evidenciam que o tratamento oral em conjunto com piperina aumentou a biodisponibilidade e a absorção de Rh2 com consequente aumento de IL-12 promovido pelo fármaco no soro dos animais. A atividade imunomoduladora de piperina também foi observada em camundongos Balb/c com dermatite atópica nas orelhas, onde o uso tópico de piperina inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e supriu uma possível resposta imunológica do tipo Th2 ao inibir STAT6/GATA3/IL-4 (Choi et al., 2020). Kumar e colaboradores estudaram o efeito da piperina em populações celulares do timo e do baço expostos a 25 μ M do inseticida nocivo deltametrina, o uso de piperina (1, 10 e 50 μ g/mL – 3,5, 35 e 175 μ M) levou a uma diminuição do efeito citotóxico do inseticida com diminuição da atividade de caspase e de produção de ROS e consequente diminuição do número de células apoptóticas em ambas as populações. Por outro lado, piperina aumentou a população celular do baço (CD19 $^+$ e CD3 $^+$) enquanto no timo, aumenta a população de linfócitos CD4 $^+$ e diminuiu a população CD8 $^+$. O alcalóide também aumenta a concentração de glutationa, além da produção de INF- γ , IL-2 e IL-4 em células estimuladas com concavalina A e expostas a deltametrina. Interessante que o autor sugere que piperina pode interagir com os receptores CD28, CD45, CD4 e CD28 das células (Kumar; Sasmal; Sharma, 2015; Kumar; Sharma, 2015).

Em outro trabalho, foi demonstrado que piperina aumentou a proliferação de linfócitos B e T estimulados com LPS e concavalina A, respectivamente. Em culturas de esplenócitos estimulados com concavalina A, piperina levou ao aumento da produção de IFN- γ e IL-2 *in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c desafiados com LPS e incubados com piperina aumentaram sua produção de NO. *In vivo*, camundongos Balb/c previamente tratados com piperina e infectados com *Mycobacterium tuberculosis* demonstraram resultados semelhantes com aumento da população de linfócitos T CD4 $^+$ e T CD8 $^+$ e de citocinas IFN- γ e IL-2 no sangue (Sharma et al., 2014). Piperina também levou ao aumento da atividade da via mTOR de proliferação celular em linhagens celulares humanas LNCaP e HeLa, linhagem celular murina RAW264.7 e em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6. Nessas últimas culturas celulares citadas, a exposição prévia com piperina nas células e posteriormente estímulo com LPS levou ao aumento de IL-6 e TNF- α via sinalização mTOR (Pan et al., 2015).

Contradicoriatamente, alguns estudos mostram que piperina pode inibir a produção de citocinas. Soutar e colaboradores (2017) mostraram *in vitro* que piperina inibiu a proliferação de linfócitos B de camundongos C57BL/6 e a expressão de moléculas de MHC II, CD40 e CD86 assim como de citocinas IL-6 e IL-10 e imunoglobulinas IgM, IgG2b e IgG3. Chuchawankul; Khorana; Poovorawan (2012) estudaram o efeito da piperina em células mononucleares de sangue periférico humano e notaram, que o composto inibiu a proliferação e a produção IFN- γ e IL-2 dessas células. Células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6 ativadas com LPS na presença de piperina diminuíram a expressão de MHC II, CD40 e CD86 e tiveram a sua produção de TNF- α e IL-12 inibida via supressão de ERK e JNK (Bae et al., 2012). O tratamento de linfócitos T de camundongos C57BL/6 tratados com piperina e posteriormente ativados com anti-CD3 e anti-CD28 inibiu a proliferação dessas células (Doucette et al., 2015).

Nosso grupo mostrou que a piperina e seu derivado fenilamida no modelo de infecção por *L. amazonensis* *in vitro* tem efeito leishmanicida em formas promastigotas e amastigotas em macrófagos infectados. Seu efeito está associado com a alteração ultraestrutural do parasita afetando a membrana mitocondrial e levando a perda do potencial da mesma, ação no ciclo celular e alteração do perfil lipídico. Corroborando com os achados da literatura, a piperina age sinergicamente com fenilamida em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* provavelmente com mecanismos de ação diferentes. O composto se mostrou seguro para uso em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c e curiosamente o tratamento com piperina diminui a produção de NO dessas células estimuladas com LPS (Ferreira et al. 2011).

A piperina é um componente ativo com particularidades que podem ser exploradas no campo farmacológico. A síntese de produtos químicos a partir de estruturas naturais não são novidade nas áreas químico/farmacêutica já que compostos naturais geralmente apresentam uma menor toxicidade para células hospedeiras. Os resultados de pesquisas de formulações bioativas são hoje utilizados em diferentes tratamentos, principalmente no câncer (Newman; Cragg, 2020). A construção de moléculas mais ativas, menos tóxicas e mais acessíveis permite associar o que tem de melhor da ação de diferentes compostos e obter fármacos cuja atividade possa ser direcionada a proteínas e enzimas alvo. Em tripanossomatídeos, como os causadores da leishmaniose, cuja infecção é de difícil tratamento e tem um potencial de cura baixo, essa via pode ser uma boa alternativa. Com

essa perspectiva, um híbrido sintético de piperina com o antifúngico protoconazol como inibidor da CYP51, foi construído pelo grupo de quimioterapia experimental do prof. Marco Edilson Lima da UFRRJ com o intuito de avaliar seu efeito leishmanicida que foi analisado pela primeira vez neste trabalho (**Figura 9**). A construção desse híbrido foi baseada na enzima CYP51 (esterol 14 α -desmetilase) que é um excelente alvo para essa família de parasitos. Apesar de ser conservada em eucariotos, sua homologia diverge entre os indivíduos em estrutura sendo rica em áreas com resíduos polares que podem ser um determinante da ação dos azóis nessa enzima (I. Lepesheva; R. Waterman, 2011; Lepesheva; Friggeri; Waterman, 2018).

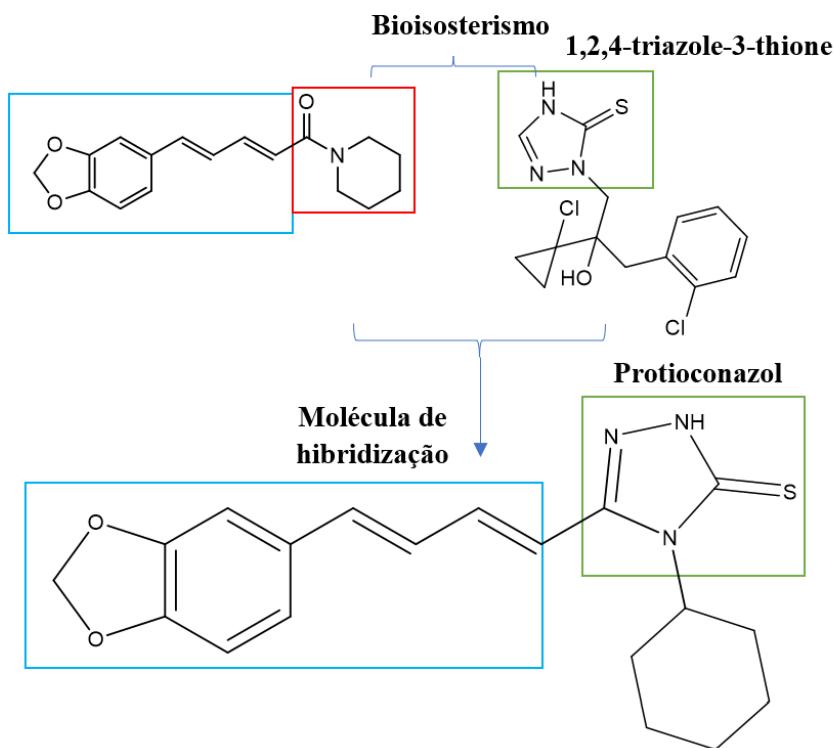


Figura 9. Estrutura química do N4-cyclohexyl-1,2,4-triazole-3-thione (AF2). Adaptado: (FRANKLIM et al., 2013).

O tratamento de doenças parasitárias como a leishmaniose apresenta vários problemas. Assim, estudos envolvendo produtos naturais e/ou sintéticos é uma importante alternativa na busca de novas substâncias com atividade microbicida e/ou imunomoduladora. Estes podem ser administrados isoladamente ou em associação com os fármacos já utilizados na clínica visando melhorar a resposta ao tratamento, reduzindo os efeitos colaterais, os custos e o aparecimento de cepas resistentes (Fampa et al., 2021; Saqib et al., 2018). Sendo assim, nesse trabalho além de analisar pela primeira vez a atividade leishmanicida do derivado sintético de piperina N4-cyclohexyl-1,2,4-triazole-3-thione (AF2) procuramos também analisar sua capacidade imunodulatória juntamente dos compostos leishmanicidas previamente estudados pelo grupo (-)-Guaiol e piperina (AF1) com a hipótese de que esses compostos possam atuar na ativação dos macrófagos utilizando modelos de estudo de linhagens de macrófagos murina e canina estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Analisar a atividade leishmanicida do derivado sintético de piperina N4-cyclohexyl-1,2,4-triazol-3-thione (AF2) em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Simultaneamente, investigar a ação imunomodulatória dos compostos (-)Guaiol, AF1 e AF2 em linhagens celulares murinas RAW 264.7, P388D1 e na linhagem celular canina DH82.

3.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a capacidade leishmanicida em formas promastigotas de *L. amazonensis* e calcular os IC₅₀ dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2;
- Avaliar a toxicidade dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2 em linhagens de células RAW 264.7, P388D1 e DH82;
- Avaliar a atividade fagocítica das linhagens celulares RAW 264.7 e DH82 tratados com (-)-Guaiol, AF1 e AF2 desafiados com formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar a produção de NO nas linhagens celulares RAW 264.7, P388D1 e DH82 estimulados ou não com LPS tratados com (-)-Guaiol, AF1 e AF2;
- Avaliar a produção de ROS nas linhagens celulares RAW 264.7, P388D1 e DH82 estimulados ou não com LPS tratados com (-)-Guaiol, AF1 e AF2;
- Identificar a expressão das moléculas MHC I/II, CD80 e CD86 nas linhagens celulares RAW 264.7, P388D1 e DH82 estimulados ou não com LPS (RAW 264.7 e DH82), infectadas ou não com *L. amazonensis* (P388D1) tratados ou não com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2;
- Medir a expressão de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-12 e IL-10) e de receptores de reconhecimento padrão (TLR4 e TLR9) em linhagens de células RAW 264.7, P388D1 e DH82 estimulados ou não com LPS tratados com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2 por qPCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos Químicos

O composto (-)-Guaiol [(3S,5R,8S)-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro- $\alpha,\alpha,3,8$ -tetramethyl-5-azulenemethanol, $\geq 95\%$] foi adquirido comercialmente pela empresa Cayman Chemical. Piperina (AF1) e o análogo sintético de piperina N4-cyclohexyl-1,2,4-triazole-3-thione (AF2) foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Marco Edilson Freire de Lima do DQO - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica/RJ. Piperina foi isolada e purificado de frutas secas de *P. nigrum* e seu derivado N4-cyclohexyl-1,2,4-triazole-3-thione foi sintetizado através de hibridização molecular do composto natural piperina e o composto protioconazol. Todos os compostos foram diluídos em DMSO em concentrações estoques de 50 mM. Anfotericina B foi dissolvida em água Mili-Q estéril. Solução de azida 2% e paraformaldeído 2% preparada em PBS 1x estéril.

4.2 Parasitos

Leishmania amazonensis (WHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas em Schneider (Schneider's Insect Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina à 26 °C.

4.3 Macrófagos

Linhagem de macrófagos murinos P388D1 foram mantidos em RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB inativado, 2 mM de L-glutamina e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina ou 100 U/ mL^{-1} de penicilina (Sigma-Aldrich) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) entre 34-37 °C / 5% CO₂. Linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 e caninos DH82 foram mantidos em meio DMEM (Sigma-Aldrich) high glucose suplementado com 10% de SFB, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina e cultivados à 34-37°C / 5% CO₂.

4.4 Inibição do Crescimento de Promastigotas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 promastigotas/mL) foram incubadas em placas de 96 poços em Schneider suplementado com 10% SFB contendo (-)-Guaiol, AF1 ou AF2 em concentrações entre 3 à 300 μ M. O medicamento padrão de tratamento Anfotericina B na concentração de 1 μ M e uma solução contendo 2% de azida sódica foram usados como controles positivos. O composto veículo DMSO foi utilizado como controle negativo nunca excedendo 1% do volume final. Os parasitas foram incubados por 48h à 26°C e após esse tempo 50 μ L de solução de XTT (Sigma-Aldrich) foi adicionada diretamente ao poço (1 mg/mL XTT + 200 Mm PMS) e após 2h a absorbância da reação foi analisada em leitor de microplaca (Bio-Rad, model 680) em filtro de 450nM. A porcentagem de células viáveis foi determinada em relação ao controle (100% viável).

4.5 Ensaio de Citotoxicidade de Macrófagos

Linhagens celulares P388D1 ($1,5 \times 10^5$ /poço), RAW 264.7 e DH82 (5×10^4 /poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços. As linhagens RAW 264.7 e DH82 foram deixados para aderir por 2h antes da adição dos compostos. Após esse tempo, as células aderidas foram lavadas 1x com PBS e em seguida foi adicionado as culturas os compostos em diferentes concentrações (linhagem celular em suspensão foi obtida, centrifugada à 300 \times g durante 10 minutos, lavada 1x com PBS e ressuspensão em meio de cultura contendo os compostos) e mantidos à 34 e 37 °C / 5% CO₂ respectivamente por 48h. Após o período de tratamento, em células P388D1 foi adicionado 16 μ l (0,033 μ g/mL) de solução de resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) diluída em PBS 1x. A viabilidade foi então verificada através da ação redox da conversão em resofurina pela atividade metabólica das células após 4h de incubação à 34 °C, com 5% de CO₂. A fluorescência foi lida usando espectrofotômetro com filtros de 535 nm (excitação) e 595 nm (emissão). Em células RAW 264.7 e DH82, foi adicionado 50 μ L de solução de XTT (e incubadas à 37 °C/ 5% CO₂ por um período entre 2 e 4h. Soluções de azida sódica 2% e de paraformaldeído 2% foram usadas como controle positivo. A porcentagem de células viáveis foi determinada em relação ao controle não tratado (100%).

4.6 Análise da atividade fagocítica.

Linhagens celulares RAW 264.7, DH82 (2×10^5 /poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas (dimensão 13 mm; espessura 0,13-0,16mm) como descrito anteriormente e logo em seguida tratadas com os compostos na concentração de 50 μ M por 24h. A concentração de DMSO nos experimentos foi de 0,2%. Após o tratamento as células foram desafiadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* (1 Macrófago: 5 promastigotas) por 2h e depois lavadas 2-3x com PBS para retirar os parasitas não internalizados. As células foram então fixadas em metanol por aproximadamente 40 minutos e coradas com Giemsa por 35-40 minutos. As lamínulas contendo as células foram então descoloridas em soluções contendo Xilol + Acetona (1° solução = 10% Xilol + 90% de Acetona; 2° solução = 30% Xilol + 70% Acetona; 3° solução = 70% Xilol + 30% Acetona; 4° solução = 100% Xilol) e coladas com EntellanTM em lâminas de microscopia. A contagem celular foi feita considerando as células não infectadas, células infectadas e o número de amastigotas internalizadas. O índice de infectividade (% de macrófagos infectados x número de amastigota por macrófago) foi determinado através da contagem de no mínimo 200 células em triplicata.

4.7 Dosagem de óxido nítrico

Linhagens celulares RAW 264.7, P388D1 e DH82 (2×10^5 /poço) foram plaqueados como descrito anteriormente. Células aderentes foram deixados para aderir por 2h. Metade das placas foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS - Sigma/ número de referência L3024 - testado para o ligante TLR4) na concentração de 100 ng/mL, 10 μ g/mL e 1 μ g/mL respectivamente por 2h. As células foram então tratadas com 50 μ M (RAW 264.7 e DH82) ou 60 μ M (P388D1) dos compostos por 48h. Após esse tempo, as células foram obtidas (células aderentes utilizando *cell scraper* – “rodinho”), centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos à 4 °C) e o NO das linhagens foram analisadas usando sonda DAF-FM Diacetate (InvitrogenTM). A sonda se liga a molécula de NO e produz um composto fluorescente benzotriazol que é detectado por fluorímetro. As células foram marcadas com solução de PBS glicose (5 mM) contendo 5 μ M de sonda e incubadas por 45 minutos em estufa à 37 °C e 5% CO₂. Células não estimuladas e estimuladas com LPS sem a marcação da sonda foram utilizadas para a análise da autofluorescência da célula. Após esse tempo, as células foram lavadas 2x com PBS para

retirar o excesso de sonda e incubadas por mais 15 minutos. Em seguida, as células foram transferidas para uma placa preta de 96 poços e a fluorescência analisada utilizando filtros com excitação de 488 e emissão de 525 em fluorímetro Hidex Chameleon - Multilabel Microplate Reader.

4.8 Dosagem de Radicais de oxigênio

Linhagens celulares RAW 264.7, DH82 e P388D1 (2×10^5 /poço) foram plaqueadas como descrito anteriormente. Metade das placas foram estimuladas com LPS na concentração de 100 ng/mL, 1 μ g/mL e 10 μ g/mL respectivamente por 2h. As células foram então tratados com 50 μ M (RAW 264.7 e DH82) ou 60 μ M (P388D1) dos compostos por 48h. Após esse tempo, as células foram obtidas (células aderentes utilizando *cell scraper* – “rodinho”) e centrifugadas à 1500 rpm, 10 minutos à 4 °C e suspensas em PBS 1x com 5 mM de glicose num volume de aproximadamente 150 μ L e contadas em câmara de Neubauer. Foi então transferido um volume de 10 μ L de solução para uma placa preta contendo 75 μ L de PBS 1x com 5 mM de glicose, 10 μ L de enzima HRP (1 U/mL) e 5 μ L de Amplex (200 μ M) gentilmente cedidos pela professora Daniela Cosentino Gomes. O resultado da reação foi lido em filtro de fluorescência com excitação de 534 nM e emissão 590 nM no tempo zero (início da reação) e depois no tempo de 60 minutos (termino da reação) e expressos em intensidade de fluorescência/célula em cada variável.

4.9 Citometria

Linhagem de macrófagos RAW 264.7 e DH82 foram plaqueados (1×10^6 células/poço) em placas de 6 poços e deixados para aderir por 2h. Após esse tempo, metade das placas foram estimuladas com LPS na concentração de 100 ng/mL + 20 ng/mL de INF- γ (RAW 264.7) ou 2 μ g/mL de LPS (DH82) por 2h. As células foram então tratadas com 50 μ M dos compostos. Após esse tempo as células foram obtidas, centrifugadas (1600 rpm; 6 minutos) e posteriormente bloqueadas com solução Fc Block (PBS 1x + SFB 5% + SF murino ou canino 5% + CD16/CD32 Fc Block—eBioscience) por 15 minutos. Logo em seguida, as células foram marcadas com anticorpos anti- MHCII – PE-Cy5 (eBioscienceTM); CD80- FITC (BD Bioscience); CD86-PE murinos e anti-

MHC II (eBioscienceTM) canino por 20 minutos no gelo. As células foram então fixadas solução Fix/Perm por 15 minutos e depois lavados 1x com solução Perm/Wash e depois analisadas em BD LSRFortessaTM X-20 Cell Analyzer. Linhagem de macrófagos P388D1 foram plaqueadas (5×10^4 /poço) e metade das placas foi infectado com *L. amazonensis* (5 parasitas x1 macrófago) tratados com 60 μ M dos compostos foram incubados a 34 °C/ 5% CO₂ por 48 h. Após esse período as células foram lavadas 1x com PBS e fixadas com paraformaldeído à 2% por 20 minutos em temperatura ambiente seguido de marcação com anticorpos MHC class I conjugado com isocianato de fluoresceína - FITC (Invitrogen) e MHC class II conjugado com fluorocromo ficoeritrina-PE (Invitrogen) murinos. A suspensão de células foi então avaliada por citometria (BD FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Os dados foram analisados usando FlowJo V10 (Tree Star Inc., USA).

4.10 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time PCR)

Macrófagos DH82 e RAW 264.7 (4×10^5 /poço) foram plaqueados e deixados para aderir por 2h. Segundo esse tempo de incubação, metade das células foram estimuladas com LPS (100 ng/mL para RAW e 1 μ g/mL para DH82) e após 2h todas as placas foram tratadas com os compostos na concentração de 50 μ M por 48h. As linhagens RAW 264.7 e DH82 foram extraídas utilizando-se de RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) e o cDNA sintetizado via GoScriptTM Reverse Transcription System (Promega). O Real time PCR foi realizado em QuantStudioTM 3 System com GoTaq qPCR Master Mix (Promega). P388D1 (5×10^4 /poço) não estimulados e tratados com 60 μ M à 34 °C / 5% CO₂ foram incubados pelo tempo de tratamento de 48 h. A extração de RNA em P388D1 foi realizada utilizando-se de NZY Total RNA Isolation kit (Nzytech Genes & Enzymes) e o cDNA foi sintetizado com o NZY First-strand cDNA Synthesis kit (Nzytech Genes & Enzymes) de acordo com as instruções do fabricante. O Real-time PCR da P388D1 foi realizado em termociclador 7500 FAST Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizando-se de SYBR Green I Dye (SYBR). A expressão gênica dos sensores e citocinas imunológicos foi quantificado através de PCR em tempo real. O número de cópias de cada gene foi normalizado com gene constitutivos HPRT ou GAPDH a fim de ajustar as diferenças quantitativas da amostra inicial de cDNA. Os primers utilizados foram obtidos dos trabalhos de House; Gregory; Catchpole, 2008; Nadaes et al., 2020; Rodrigues et al., 2006; Valério-Bolas et al., 2019; Zaheer et al., 2007 e estão listados no quadro abaixo.

1.0 Quadro de primers utilizados para análise de expressão gênica através de qPCR

Linhagem Murina P388D1		
	Foward	Reverse
IL-12p40	5'-AGACCCCTGCCATTGAAGT-3'	5'-AAGAAGCTGGTGCTGAGTTCTCA-3'
IL-10	5'-CAAGGCAGCCTTGCAGAAA-3'	5'-CAGTAAGAGCAGGCAGCATAGC-3'
IL-1 β	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'	5'-ATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
HPRT	5'-GCTCGAGATGTATGAAGGAGAT-3'	5'-CCAGCAGGTCAAGAAAGAAGT-3'
TLR4	5'-CGCTTTCACCTCTGCCTTCACTACAG-3'	5'-ACACTACCACAATAACCTCCGGCTC-3'
TLR9	5'-ACTCGTCCACCTGTCCAAC-3'	5'-TCATGTGGCAAGAGAAGTGC-3'

Linhagem Murina RAW 264.7		
	Foward	Reverse
IL-12	5'-TCAAGAGCAGTAGCAGTTCCCCTG-3'	5'-GGTCCAGTGTGACCTTCTCTGCA-3'
IL-10	5'-CCCAGAAATCAAGGAGCATT-3'	5'-TCACTCTCACCTGCTCCAC-3'
GAPDH	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
TLR4	5'-CGCTTTCACCTCTGCCTTCACTACAG-3'	5'-ACACTACCACAATAACCTCCGGCTC-3'
TLR9	5'-ACTCGTCCACCTGTCCAAC-3'	5'-TCATGTGGCAAGAGAAGTGC-3'

Linhagem canina DH82		
	Foward	Reverse
IL-12	5'-GCGTCTTCCCTCATGACC-3'	5'-GGGTGCCAGTCCAAGTCTAC-3'
IL-10	5'-GGTTGCCAGCCCTGTCGG-3'	5'-GCGTCGCAGCCTCAGTCTCA-3'
GAPDH	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
TLR4	5'-CAAAATCCCCAACACATCC-3'	5'-TGGTTAGGCCCTGATATGC-3'
TLR9	5'-GCCTGGAGTACCTGCTCTG-3'	5'-AGGCTTGGTTTGGTGATG-3'

5 RESULTADOS

5.1 Atividade citotóxica dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

5.1.1 Atividade leishmanicida dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

Primeiramente, investigamos a atividade leishmanicida do composto AF2 e confirmamos o efeito citotóxico dos compostos (-)-Guaiol e AF1 para formas promastigotas de *L. amazonensis* através do ensaio de XTT que relaciona a viabilidade celular com a atividade mitocondrial. A intensidade colorimétrica do reagente é proporcional a atividade de enzimas mitocondriais correlacionado com o número de parasitos vivos. Os resultados demonstram que o tratamento por 48h com (-)-Guaiol inibiu 64%, 62%, 61%, 55%, 42%, 27%, 17% e 4% nas concentrações de 300, 200, 150, 100, 50, 25, 12, 6 e 3 μ M respectivamente com um $IC_{50}= 56,24 \mu$ M. No tratamento com AF1 a inibição foi de 100%, 93%, 78%, 41%, 40% e 34% em 100, 50, 25, 12, 6 e 3 μ M sendo seu $IC_{50}= 9,36 \mu$ M. Já AF2 levou a inibição de 100%, 100%, 100%, 73%, 22% e 7% nas mesmas concentrações com um $IC_{50}= 8.73 \mu$ M. O diluente dos compostos, DMSO na concentração de 0,6% e 0,2% apresentaram uma inibição de 17% e 18% respectivamente. Em contrapartida, o medicamento referência para o tratamento da leishmaniose, a anfotericina B, na concentração de 1 μ M apresentou 91% de inibição dos parasitos. De forma semelhante, a solução à 2% de azida sódica levou à 93% de inibição (**Figura 10**).

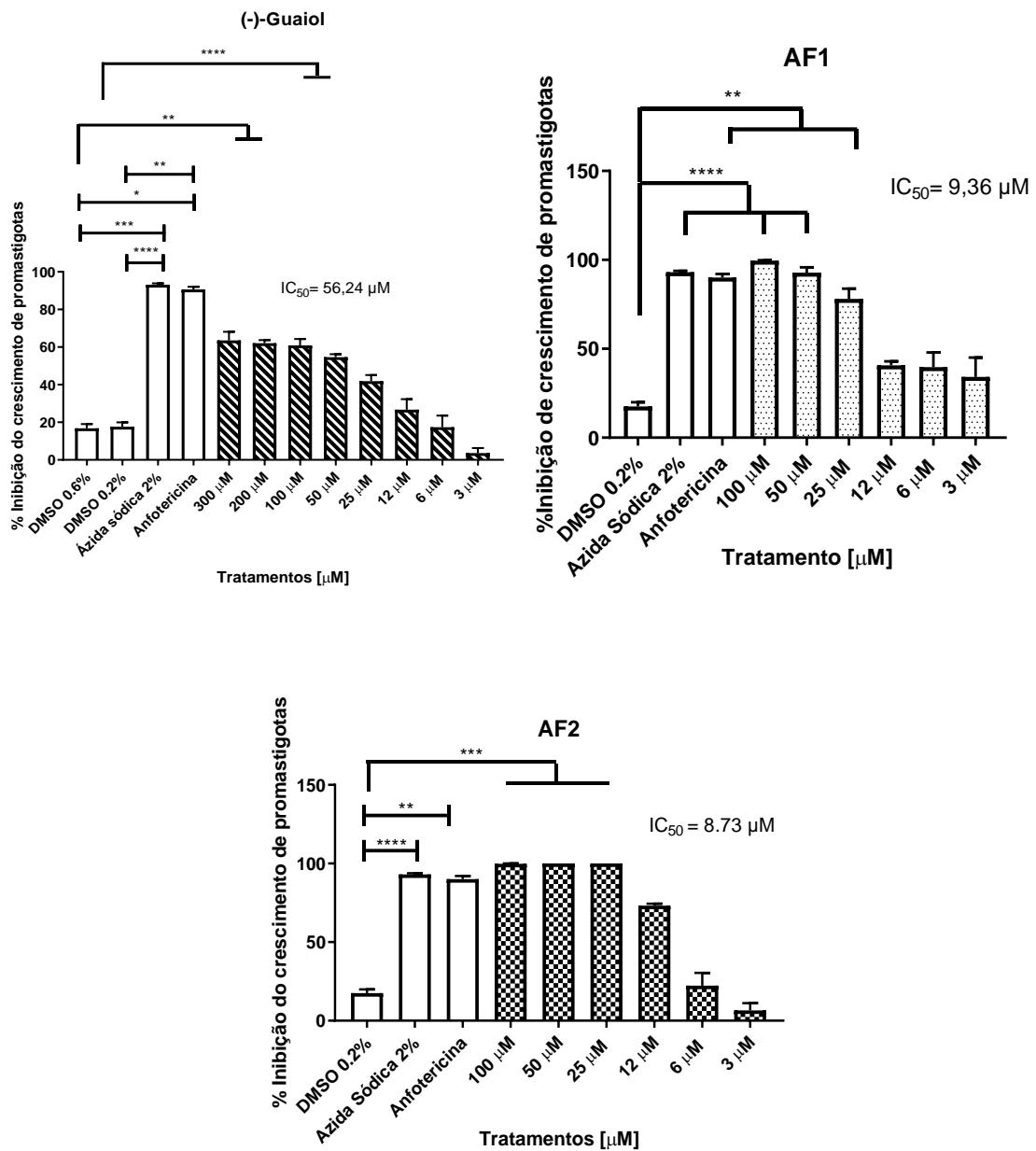


Figura 10. Atividade leishmanicida. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas na presença dos compostos em diferentes concentrações por 48h/26°C. A inibição do crescimento celular foi analisada pelo teste colorimétrico de XTT de atividade mitocondrial. Os resultados são expressos em média \pm SEM. **** $P \leq 0,001$, * $P < 0.05$ estatisticamente significantes em relação ao respectivo DMSO. DMSO 0.6% e 0.2% = controle negativo; Anfotericina [1 μ g/mL] e solução de Azida Sódica 2% = controle positivo.

5.1.2 Análise da citotoxicidade em linhagens celulares tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

Compostos farmacológicos promissores devem ser seguros para os pacientes nas concentrações de uso. Sendo assim, foi analisado em seguida a capacidade citotóxica dos compostos em linhagens de macrófagos murinos P388D1 (**Fig. 11 A**), RAW 264.7 (**Fig. 11 B**) e caninos DH82 (**Fig. 11 C**) em diferentes concentrações. A linhagem celular P388D1 na concentração de 100 μ M e 60 μ M de (-)-Guaiol apresentam viabilidade celular de 75% e 81% respectivamente. No tratamento com AF1 a viabilidade celular ficou em torno de 83% e 85%. Já nas células tratadas com AF2 a viabilidade foi de 84% e 94% nas mesmas concentrações. Em linhagem RAW 264.7, o tratamento com (-)-Guaiol, as células apresentaram viabilidade entre 85% e 97%. No tratamento com AF1, as porcentagens de viabilidade ficaram em 97%, 98%, 93%, 95%, 97% e 95% enquanto em AF2 as porcentagens foram de 92%, 88%, 82%, 82%, 87% e 90% respectivamente. Para a linhagem celular DH82, o tratamento com (-)-Guaiol levou a uma viabilidade celular entre 81% à 97%. Com AF1 as porcentagens foram 97%, 90%, 88%, 92%, 95% e 91% seguido de 89%, 83%, 81%, 83%, 91% e 93% em AF2. Em nenhuma das concentrações utilizadas foi observado perda de viabilidade abaixo dos 70% (**Figura 11**).

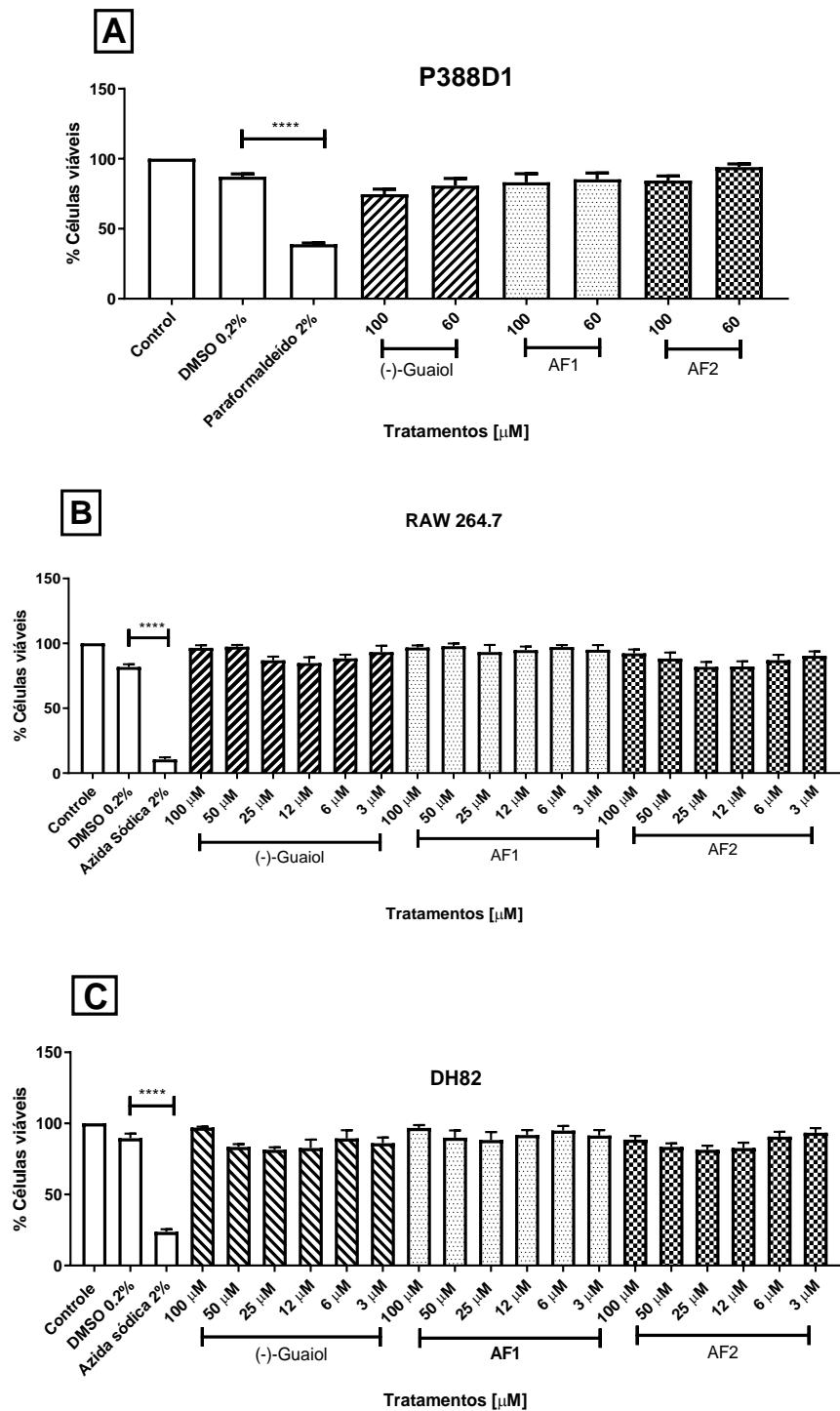


Figura 11. Viabilidade das linhagens celulares. Linhagens de macrófagos murinos P388D1 (A), RAW 264.7 (B) e canina DH82 (C) foram plaqueadas e tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2 em diferentes concentrações por 48h. A viabilidade celular dos macrófagos foi avaliada pelos testes colorimétricos Rezasurina (P388D1) e XTT (RAW 264.7 e DH82) para avaliação de atividade mitocondrial. Os dados são expressos em média \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$ estatisticamente significante em relação ao DMSO. DMSO 0.2% = controle negativo; Solução de Azida Sódica 2% e Solução de paraformaldeído 2% = controle positivo.

5.2 Análise do efeito imunomodulador dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

5.2.1 Avaliação da atividade fagocítica das linhagens tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

Os macrófagos têm como sua função primordial, após o reconhecimento do microrganismo, a fagocitose do mesmo. Uma vez internalizado, o micro-organismo ficará no interior do fagolisossomo onde será degradado e metabolizado pela célula. Fomos averiguar a capacidade fagocítica dos macrófagos tratados com os compostos e desafiados com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos murinos RAW 264.7 (**Fig. 12 A**) não tiveram sua atividade fagocítica alterada após o tratamento com os compostos. Os macrófagos caninos DH82 (**Fig. 12 B**), no entanto, quando tratadas com AF2 tiveram uma redução na sua atividade fagocítica de 1.4x (29%) (**Figura 12**).

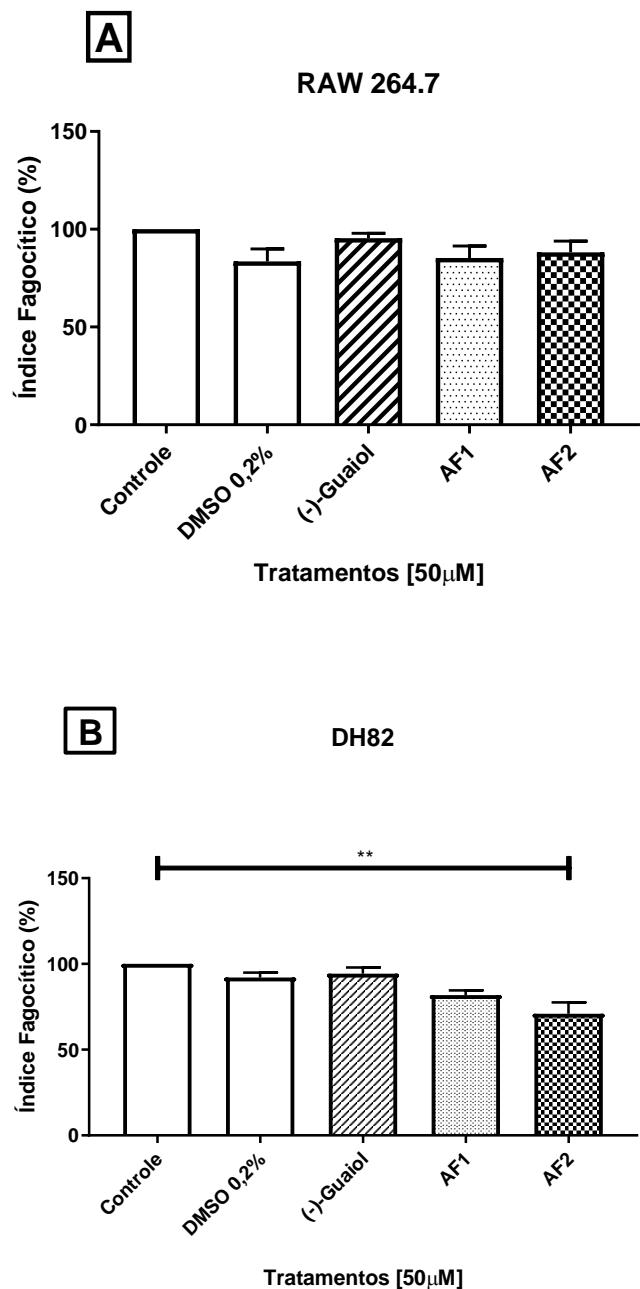


Figura 12. Atividade fagocítica. Linhagens de macrófagos murina RAW 264.7 (A) e canina DH82 (B) foram plaqueadas e tratadas com 50 μ M dos compostos ((-)-Guaiol, AF1 e AF2) por 24h. Após esse tempo as células foram desafiadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5p:1mo por 2h e então fixadas em metanol e coradas com Giemsa. O índice fagocítico foi determinado pela contagem de no mínimo 200 células. Os dados são expressos em média \pm SEM. ** $P \leq 0.01$ e * $P < 0.05$ estatisticamente significante em relação ao controle. DMSO 0.2% = controle negativo.

5.2.2 Avaliação da produção de óxido nítrico das células tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

Um dos mecanismos microbicidas dos macrófagos é a produção de óxido nítrico. Dessa forma, fomos avaliar a produção de NO nos macrófagos tratados com os compostos utilizando-se de uma sonda intracelular DAF-FM *Diacetate*, onde é possível detectar de forma direta, a produção de pequenas concentrações [~3 nM] de NO produzidos pela célula. Como esperado, o estímulo com LPS levou a produção de NO nos macrófagos sem tratamento. Resultados preliminares demonstram que a linhagem P388D1 (**Fig. 13 A**) quando estimulada com LPS e tratada com (-)-Guaiol diminuem a produção de óxido nítrico em 1.3x enquanto AF2 aumenta a produção em 1.4x. Os compostos não alteram a produção de NO nos macrófagos murinos RAW 264.7 (**Fig. 13 B**) em repouso. Os tratamentos com (-)-Guaiol, AF1 e AF2 na concentração de 50 μ M levaram a um aumento de 1.1x, 2.2x e 2.2x na produção de NO nas células RAW 264.7 estimuladas com LPS, respectivamente. Células DH82 (**Fig. 13 C**) não estimuladas e tratadas com (-)-Guaiol diminuíram em 1.6x a produção de NO, diferentemente das células tratadas com AF2 que aumentaram a produção em 1.5x. Já em células DH82 estimuladas com LPS e tratadas com os compostos, não observamos alterações na expressão de NO (**Figura 13**).

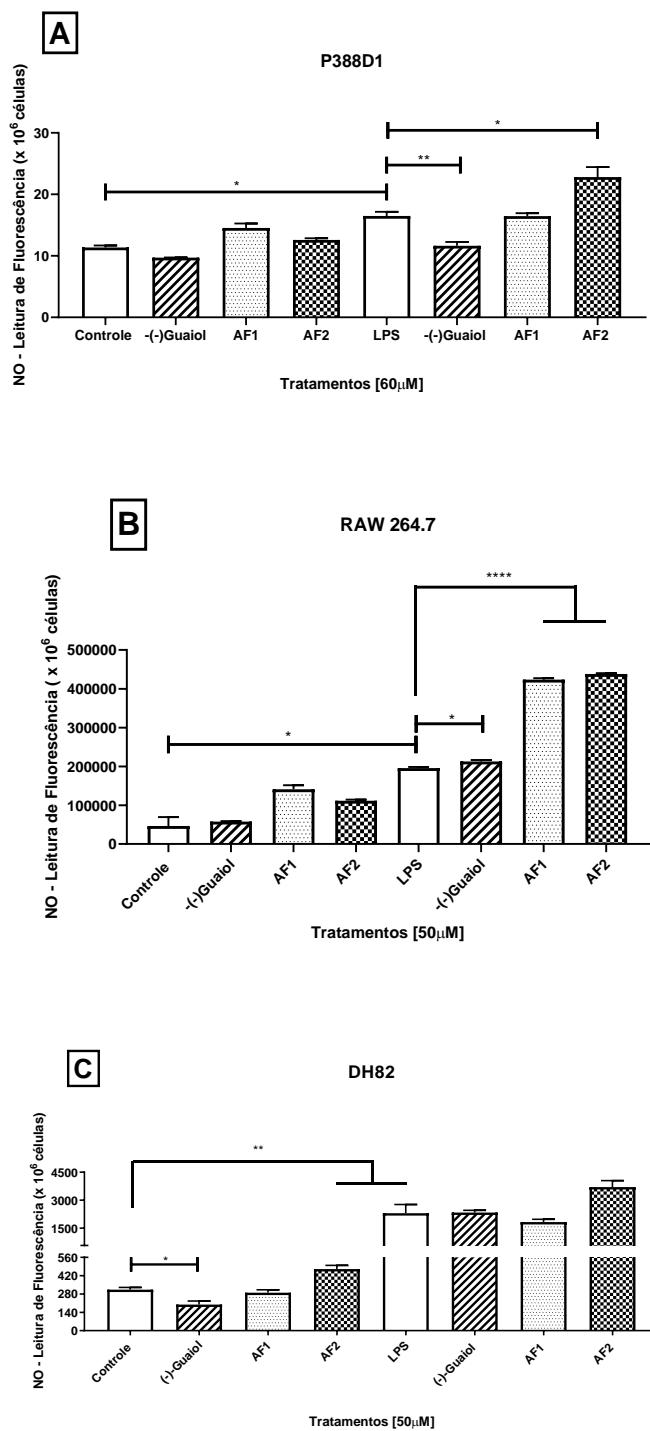


Figura 13. Avaliação da produção de óxido nítrico de linhagens celulares. Macrófagos em repouso ou ativados com 100 ng/mL (RAW - B), 1 μ g/mL (DH82 - C) e 10 μ g/mL (P388D1 - A) de LPS foram tratados ou não com 50 μ M ou 60 μ M de (-)-Guaiol, AF1 e AF2 por 48 horas. As linhagens celulares foram recolhidas e marcadas com sonda fluorescente DAF-FM para a análise de concentração de NO. Os dados são expressos em média \pm SEM. *** $P \leq 0.0001$, ** $P \leq 0.01$ e * $P < 0.05$ estatisticamente significante.

5.2.3 Avaliação da produção de radicais de oxigênio das linhagens tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

Assim como NO, a produção de ROS após um estímulo celular desempenha um importante papel na morte de patógenos intracelulares. Avaliamos a produção de ROS dos macrófagos estimulados ou não com LPS e tratados com os compostos na concentração de 50 μ M com sonda Amplex red que detecta o produto metabólico peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Resultados preliminares demonstram que os tratamentos não alteraram a produção de ROS em macrófagos murinos P388D1 (**Fig. 14 A**) em repouso. Em P388D1 estimuladas com LPS, o tratamento com (-)-Guaiol e AF1 levaram a diminuição da produção de ROS em 1.1x e 1.2x. Células murinas RAW264.7 (**Fig. 14 B**) não estimuladas aumentaram a produção de ROS após o tratamento com AF1 e AF2 em 1.8x e 1.5x respectivamente. Já quando eram estimuladas com LPS e tratadas com AF2 diminuíram a produção de ROS em 1.6x. Na linhagem celular canina DH82 (**Fig. 14 C**) o tratamento com AF1 diminuiu a produção de ROS em 2.1x enquanto AF2 aumentou em 2.4x a produção de ROS em células caninas DH82 em repouso. O (-)-Guaiol em células DH82 estimuladas com LPS levou a um aumento de 1.3x da produção de ROS, enquanto que o AF1 levou a uma queda na produção de ROS de 2.2x (**Figura 14**).

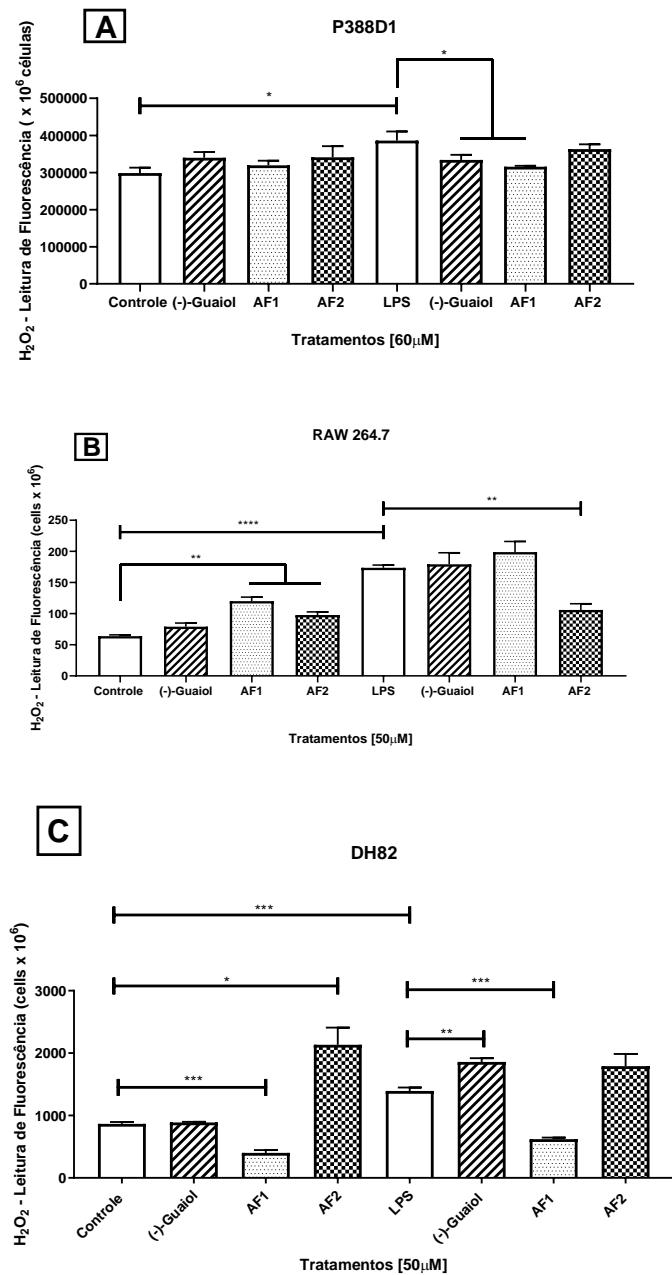


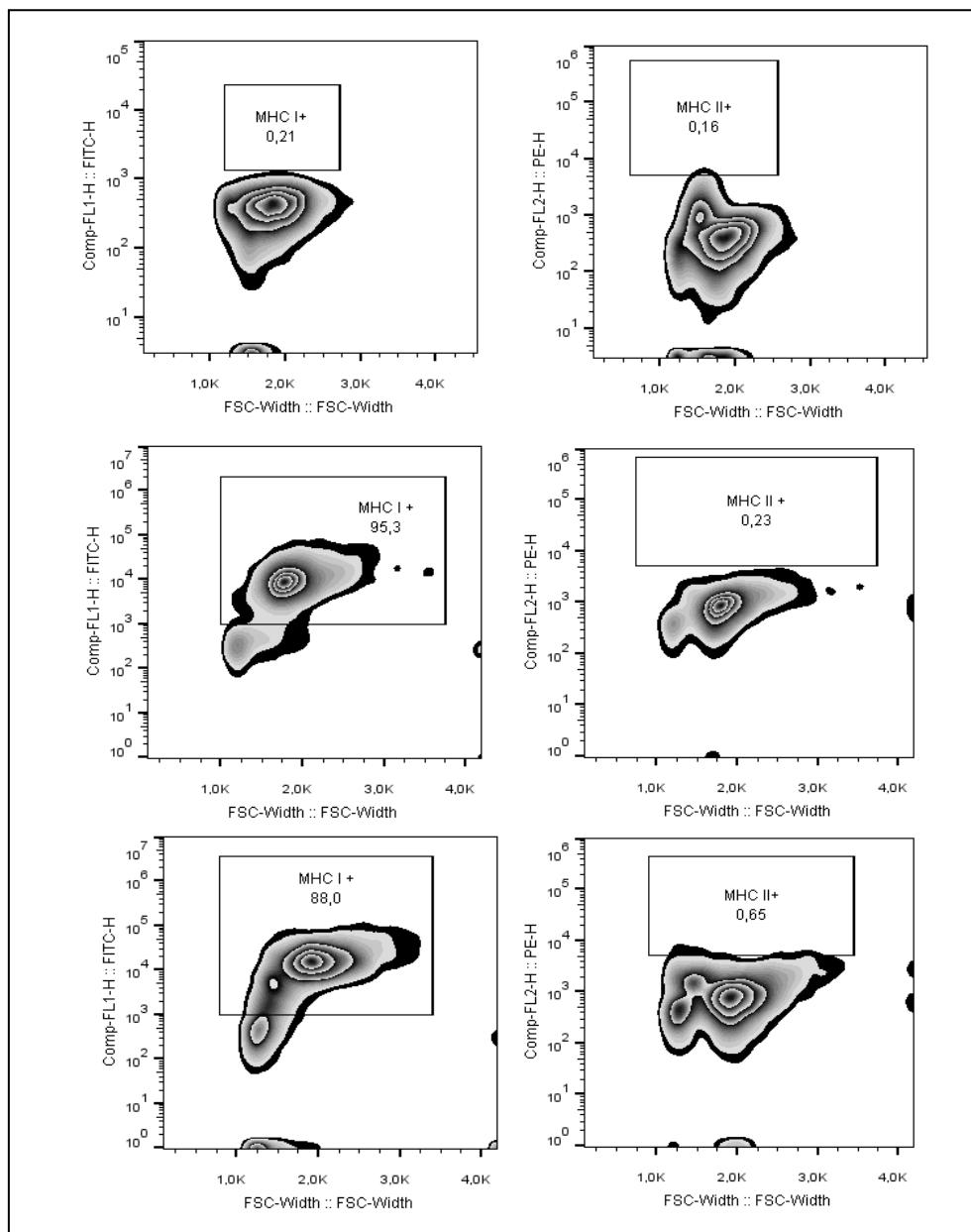
Figura 14. Avaliação da produção de radicais de oxigênio de linhagens celulares.
 Macrófagos em repouso ou ativados com 100 ng/mL (RAW 264.7 - C), 1 μ g/mL (DH82 - B) e 10 μ g/mL (P388D1 - A) de LPS foram tratados ou não com 50 μ M (RAW 264.7 e DH82) e 60 μ M (P388D1) de (-)-Guaiol, AF1 e AF2 por 48 horas. A quantificação de ROS foi analisado por fluorescência através da reação com o reagente Amplex Red. Os dados são expressos em média \pm SEM. **** $P \leq 0.0001$, ** $P \leq 0.01$ e * $P < 0.05$ estatisticamente significante. Os gráficos de RAW 264.7 e DH82 são representativos de 2 experimentos independentes em triplicata enquanto o gráfico de P388D1 é relativo a 1 experimento em triplicata.

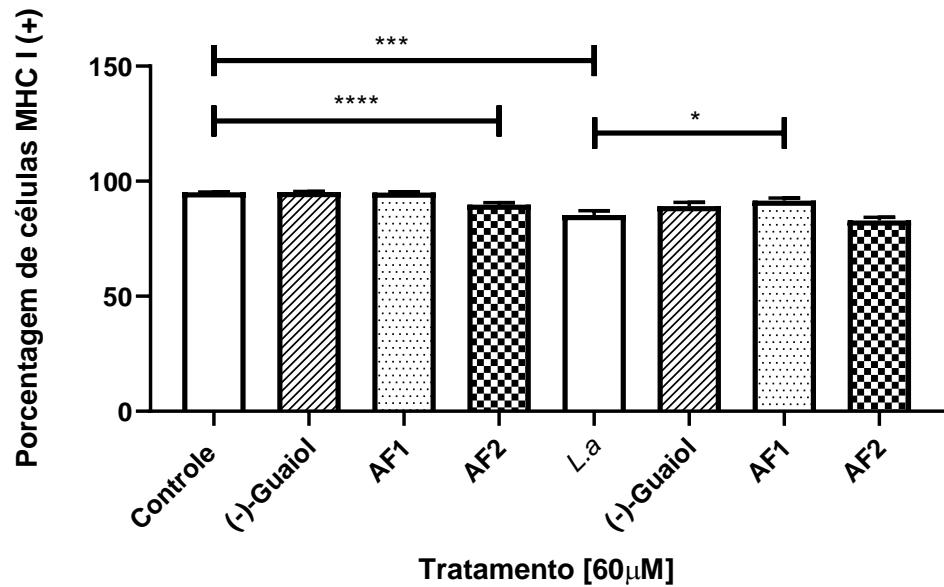
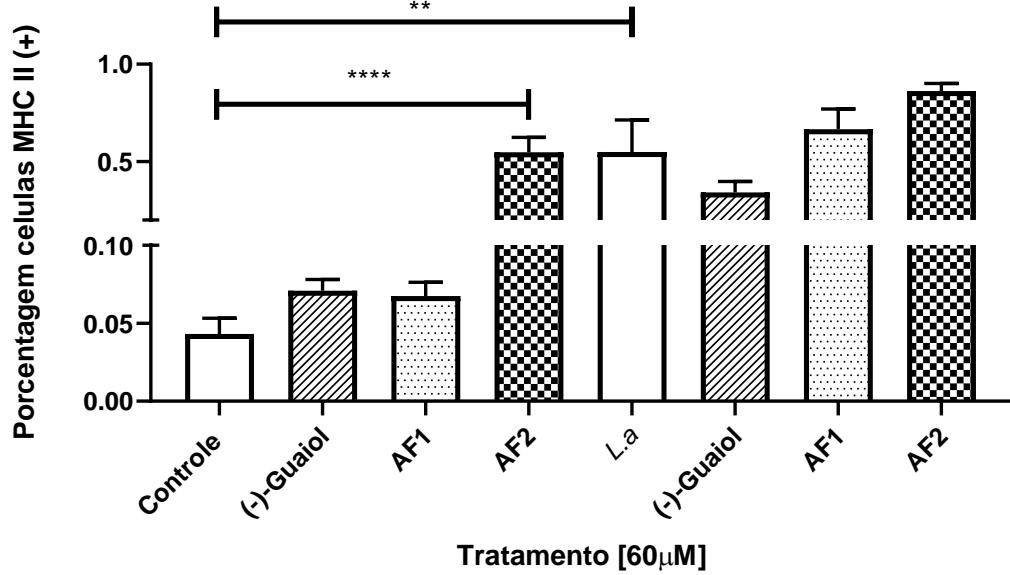
5.2.4 Análise da expressão de moléculas MHC e co-estimulatórias nas linhagens de macrófagos tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

As células do sistema imunológico inato possuem moléculas de apresentação de antígeno que formam uma ponte entre a resposta imunológica inata e adaptativa. Sendo assim, investigamos a expressão de moléculas MHC e co-estimulatórias nos macrófagos frente ao tratamento com os compostos. Os resultados com a linhagem celular P388D1 (**Fig. 15 A, B**) apontam que a infecção por *L. amazonensis* diminuiu a expressão de MHC I em 1.1x enquanto aumentou em 14x a expressão de MHC II na linhagem P388D1. O tratamento com 60 μ M de AF2 reduziu aproximadamente 1x a expressão da molécula MHC I⁺ em células P388D1 em repouso. O tratamento com AF2 levou a um aumento de 13x da expressão de MHC II em células em repouso. Já o tratamento nas células P388D1 infectadas com *L. amazonensis*, AF1 aumentou em 1.1x a expressão de MHC I nas células tratadas em relação as células infectadas e não tratadas. Não observamos alteração na expressão de MHC II nas células infectadas após o tratamento com os compostos. Linhagem celular murina RAW 264.7 (**Fig. 15 C, D**) não apresentou diferença na expressão de MHC II⁺, CD86⁺ e CD80⁺ nas células em repouso ou estimuladas com LPS+INF- γ e tratadas com os compostos. Resultados preliminares demonstram que os compostos levam a uma diminuição na expressão de MHC II em linhagem celular canina DH82 (**Fig. 15 E, F**) não estimulada e estimulada com LPS (**Figura 15**).

P388D1 (A)

NM
Controle
L.a



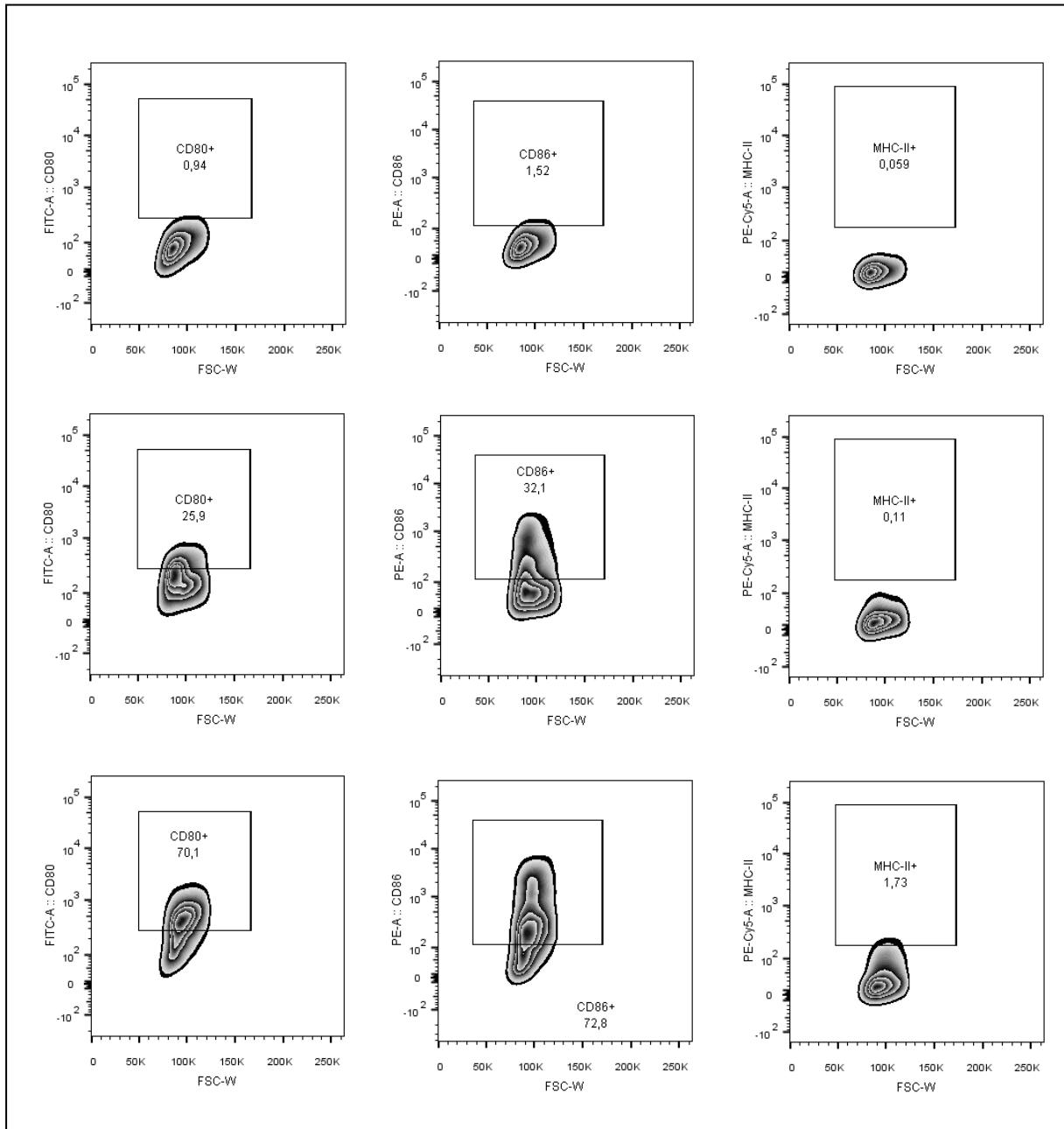
B**P388D1 (MHC I+)****P388D1 (MHC II+)**

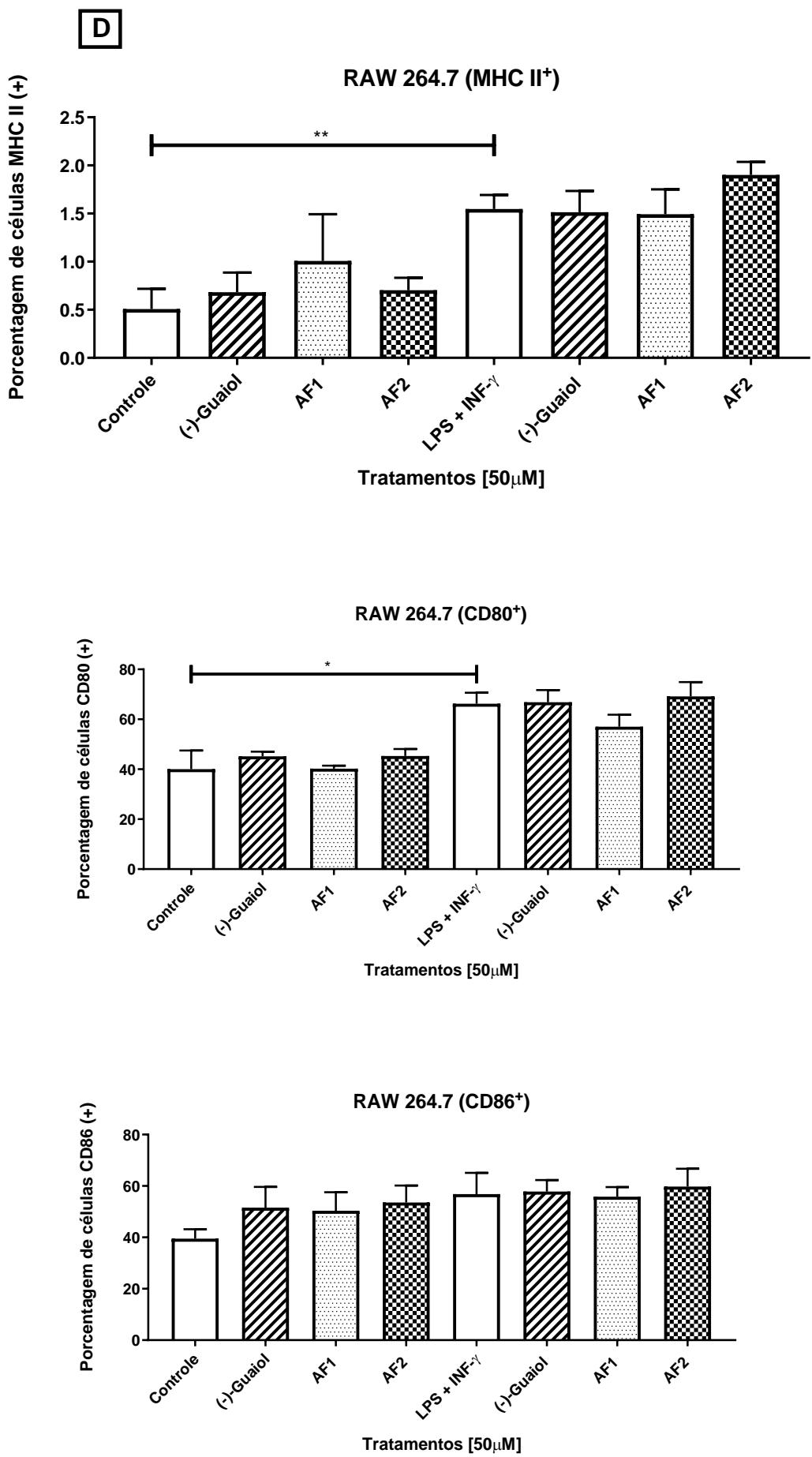
RAW 264.7 (C)

NM

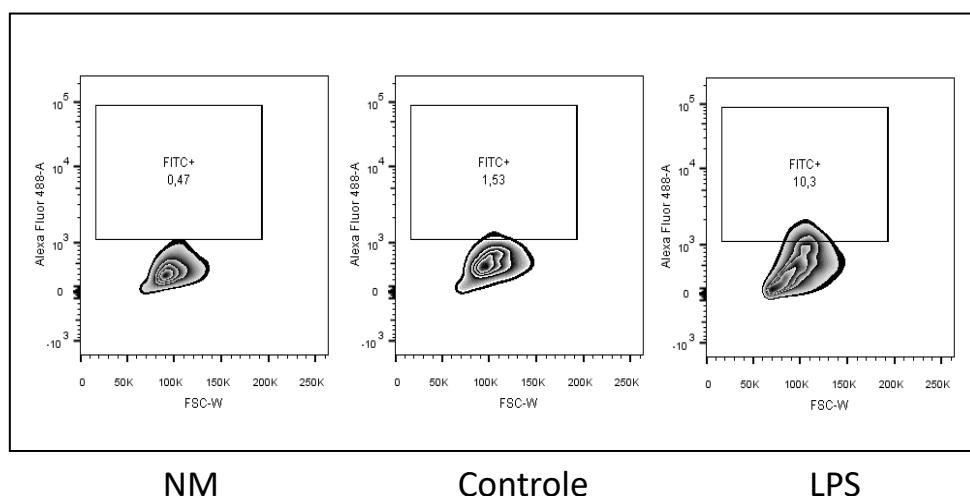
Controle

LPS





DH82 (E)



F

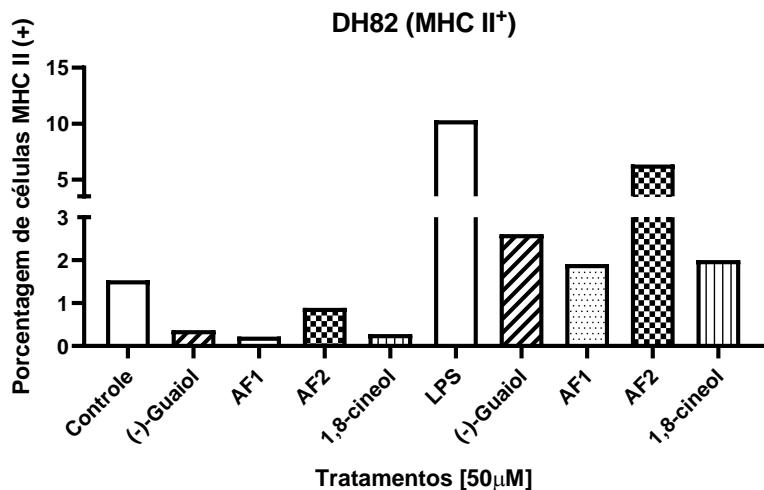


Figura 15. Expressão de moléculas de MHC e co-estimulatórias nas diferentes linhagens celulares após o tratamento. Macrófago murino P388D1 em repouso ou infectadas com *L. amazonensis*, macrófagos murinos RAW 264.7 em repouso ou estimuladas com LPS (100 ng/mL) + INF- γ (20 ng/mL) e macrófagos caninos DH82 não estimuladas ou estimuladas com LPS (2 μ g/mL) foram tratadas ou não com 50 μ M (RAW 264.7 e DH82) ou 60 μ M (P388D1) dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2. Após 48h, as células foram fixadas e marcadas com anticorpos para moléculas MHC I/II, CD80 e CD86 seguido de análise por citometria. A, C e E gráficos Zebra Plot da marcação celular. B, D e F gráficos representativos do Zebra Pot. NM – Células não marcadas; *L.a* – *Leishmania amazonensis*. Os resultados são expressos em média \pm SEM **** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ e * $P < 0.05$ estatisticamente significante. Gráfico DH82 referente a 1 experimento com análise de 50.000 eventos.

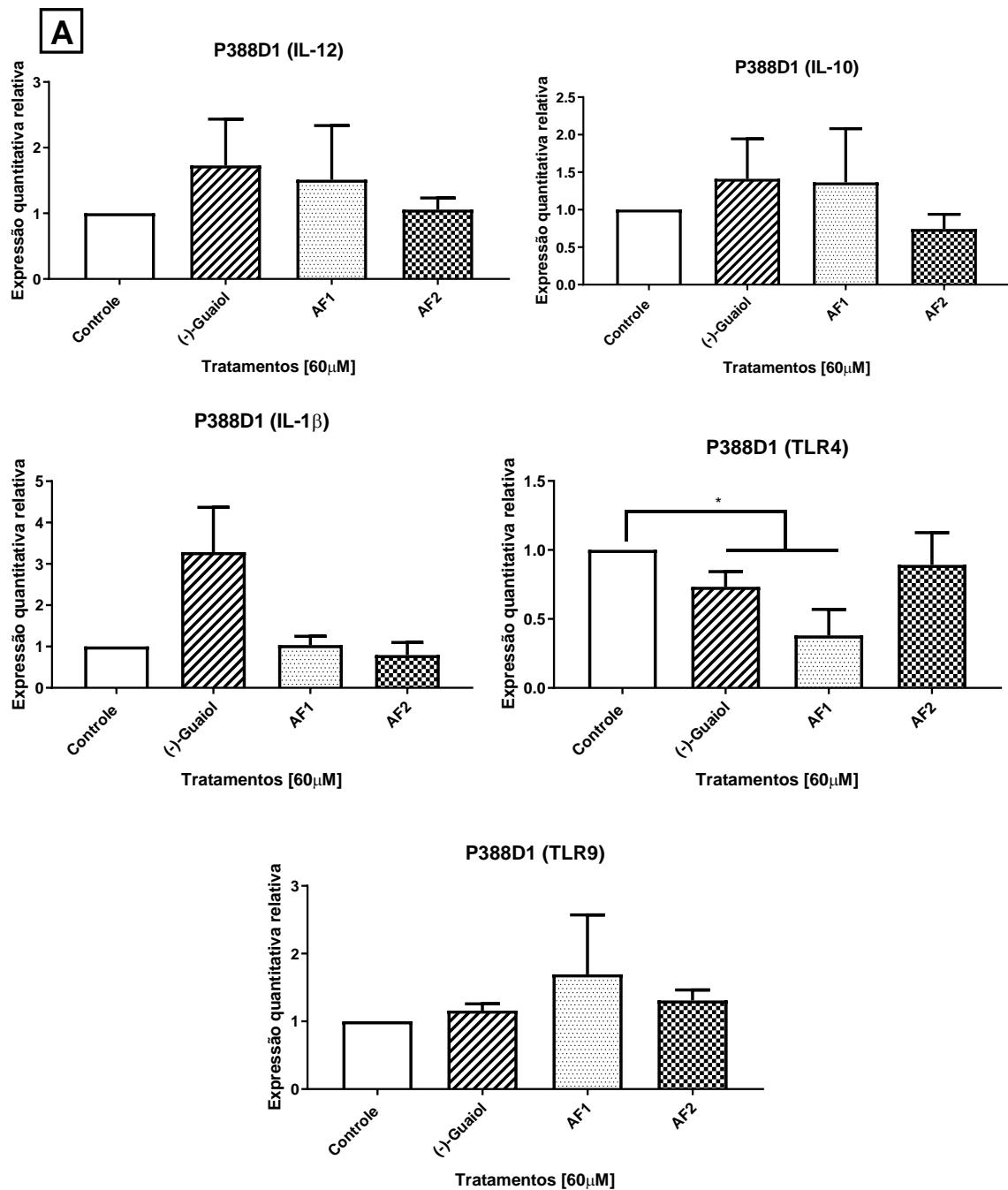
5.2.5 Expressão de citocinas e receptores TLR das linhagens celulares tratadas com os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2.

Os macrófagos após ativação apresentam características que podem modular a resposta inflamatória. Com isso, fomos averiguar a ação dos compostos nas linhagens murina P388D1 (**Fig. 16 A**), RAW 264.7 (**Fig. 16 B**) e canina DH82 (**Fig. 16 C**) através da expressão de citocinas inflamatórias e receptores PRR's utilizando-se de PCR em tempo real. Resultados em linhagem celulares P388D1 sem estímulo demonstram que embora há um aumento de 3.2x na expressão de IL-1 β nas células tratadas com (-)-Guaiol, não foi significativo em relação ao controle. Com isso, os compostos não alteraram a produção das citocinas IL-1 β , IL-10 e IL-12 e nem a expressão do receptor TLR9 na linhagem P388D1. Os tratamentos com (-)-Guaiol e AF1 levaram a uma redução de 1.4x e 2.5x na expressão de TLR4 em células P388D1 não estimuladas.

Os tratamentos com (-)-Guaiol e AF1 aumentaram em torno de 1.5x a expressão de IL-10 em macrófagos murinos RAW 264.7 em repouso. Em células previamente estimuladas com LPS e tratadas com os compostos houve uma redução da expressão de IL-10 em torno de 1.3x. Em relação a expressão da citocina IL-12 não observamos alteração na expressão da citocina nas células murinas RAW264.7 em repouso tratadas com os compostos. No entanto, houve uma redução da expressão de IL-12 nas células estimuladas com LPS e tratadas com os compostos. Essa redução foi maior com os compostos AF1 e AF2 (3x) do que a observada com (-)-Guaiol (1.3x). Em relação aos receptores TLR, observamos que em células murinas RAW 264.7 sem estímulo não há alteração da expressão de TLR4 e TLR9 após tratamento com os compostos. Enquanto em células murinas RAW 264.7 estimuladas com LPS, os tratamentos com os compostos levaram a uma redução que varia de 1.5x à 2x. Também nessas células se observa uma drástica redução na expressão do receptor TLR9 de 6.1x e 4.2x após tratamento com (-)-Guaiol, AF1 e AF2 respectivamente.

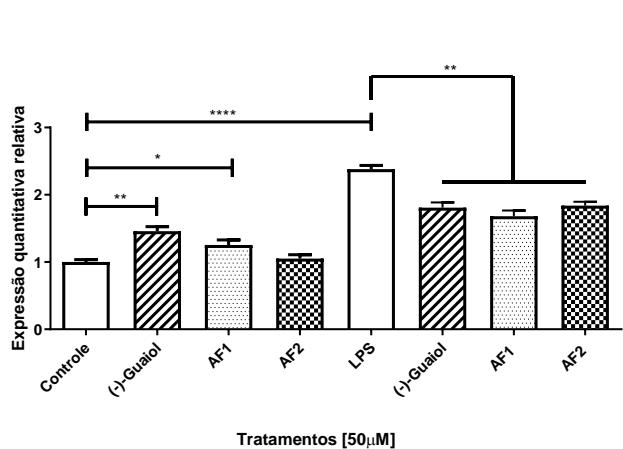
A análise dos macrófagos caninos DH82 demonstrou que assim como observado em RAW 264.7, a expressão de IL-10 aumentou em células em repouso tratadas com (-)-Guaiol e AF1 em 3.3x e 1.6x respectivamente. Novamente os compostos levaram a uma diminuição da expressão de IL-10 nas células estimuladas com LPS em torno de 1.4x. As expressões de IL-12, TLR4 e TLR9 não foram alteradas nas células caninas DH82 em repouso após tratamentos com os compostos. Porém, se observa que em células caninas DH82 estimuladas com LPS os tratamentos diminuíram em 1.5x, 1.2x e 1.6x a expressão

de IL-12 respectivamente. A expressão do receptor TLR4 reduziu aproximadamente 1,6x enquanto a expressão de TLR9 diminuiu até 2x após tratamento (Figura 16).

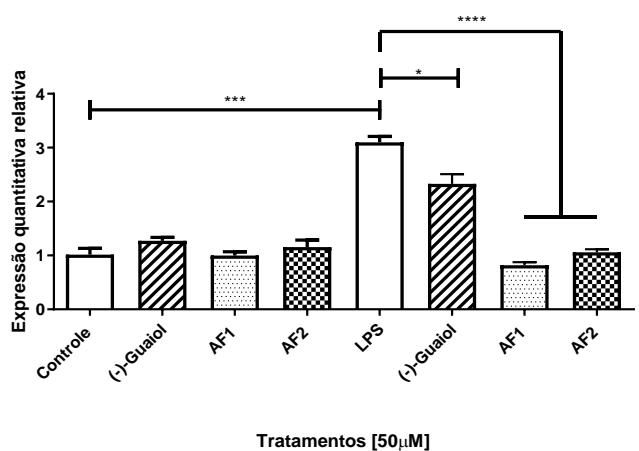


B

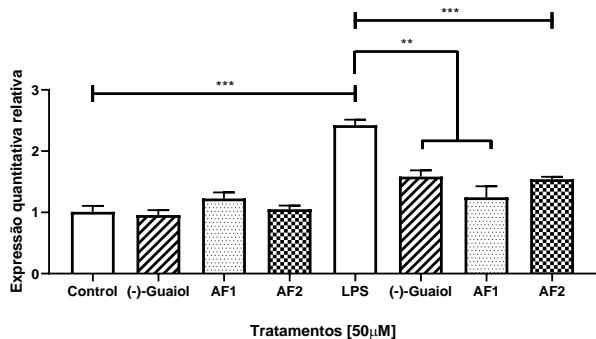
RAW 264.7 (IL-10)



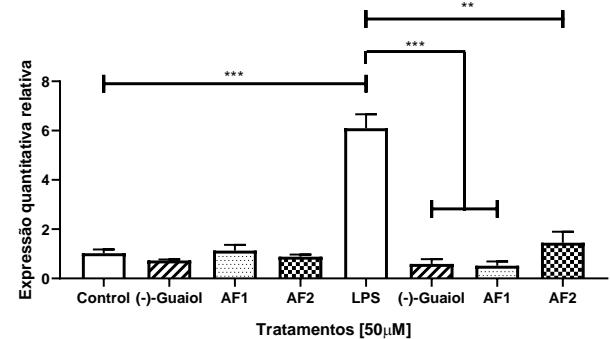
RAW 264.7 (IL-12)



RAW 264.7 (TLR4)



RAW 264.7 (TLR9)



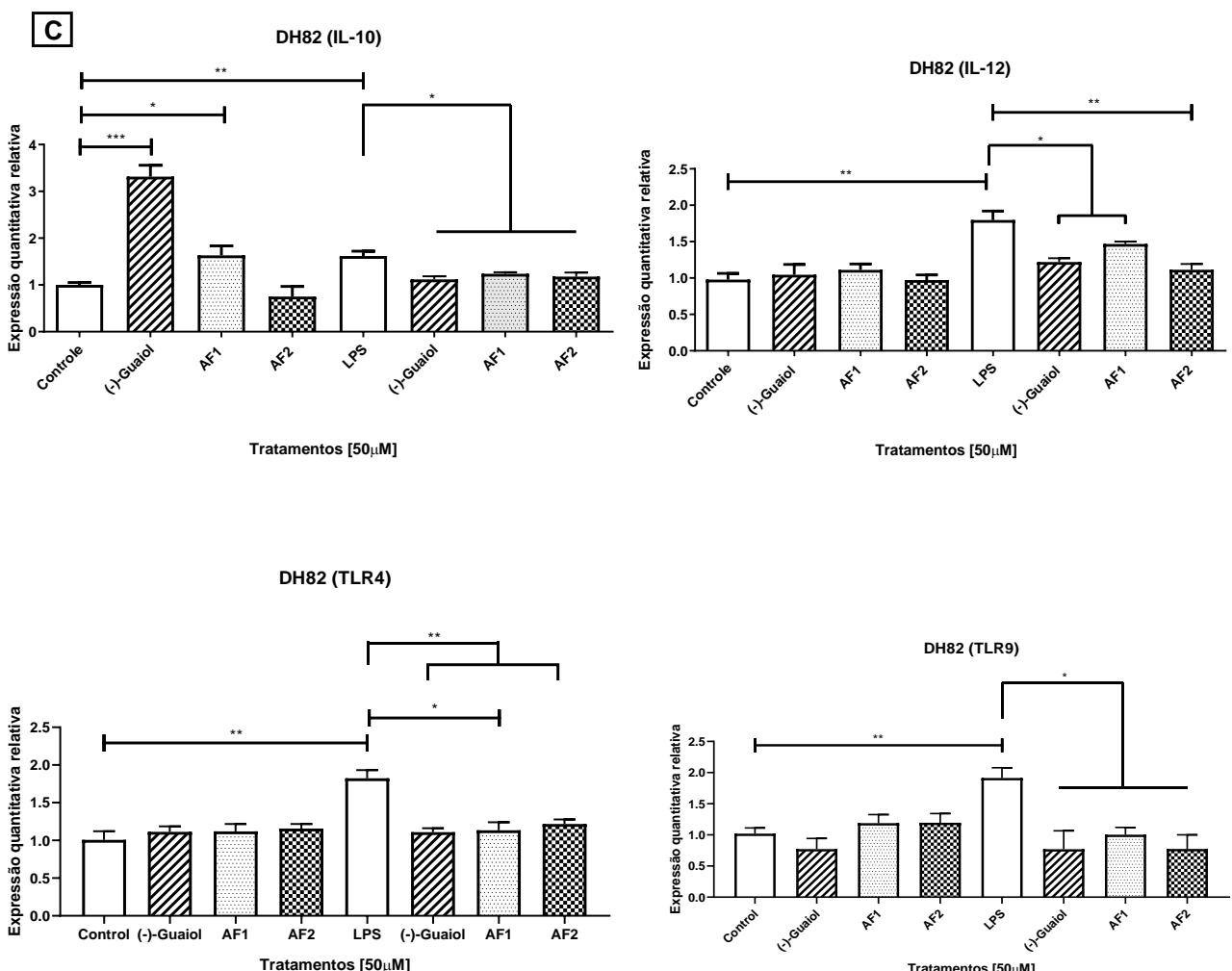


Figura 16. Expressão de citocinas e receptores TLR nas diferentes linhagens celulares após o tratamento. Linhagem celular P388D1 (A) em repouso foram tratadas com os compostos ((-)-Guaiol, AF1 e AF2) na concentração de 60 μ M. Linhagens RAW 264.7 (B) e DH82 (C) não estimuladas e estimuladas com LPS (100ng/mL e 1 μ g/mL respectivamente) foram tratadas com 50 μ M dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2. Após 48h o mRNA foi extraído para quantificação por PCR em tempo real da expressão de citocinas e receptores de reconhecimento padrão. Os dados obtidos foram normalizados utilizando primers para gene endógeno HPRT ou GAPDH respectivamente. Os resultados são expressos em média \pm SEM. **** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ e * $P < 0.05$ estatisticamente significante.

6 DISCUSSÃO

Compostos imunomoduladores podem ser capazes de atuar em componentes da imunidade inata e/ou adquirida e dessa forma afetar o curso da resposta inflamatória. Vários compostos sintéticos ou naturais têm sido descritos como imunomoduladores (Jantan; Ahmad; Bukhari, 2015; Saqib et al., 2018). A leishmaniose é uma doença zoonótica, cuja resposta desencadeada pelo parasito pode definir o quadro de susceptibilidade ou resolução da doença. O tratamento em si foca na eliminação do agente parasitário. No entanto, observa-se que não é o suficiente para garantir o controle definitivo do patógeno e contribui para a seleção de organismos cada vez mais resistentes. A dinâmica entre o parasito e seu hospedeiro é uma balança, onde por um lado pode-se ter o agravamento da infecção e por outro o controle do parasito. Entretanto, a resolução das lesões não significa a eliminação do parasito podendo retornar novamente o quadro infeccioso ou até mesmo o desenvolvimento de outra manifestação clínica como a leishmaniose pós-Kalazar ou a forma mucocutânea após uma lesão cutânea (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Conceição-Silva; Morgado, 2019; Sasidharan; Saudagar, 2021).

Não é novidade que os produtos naturais são fonte de moléculas para análises farmacológicas, e que seu estudo permite o entendimento de sua atividade e a síntese de moléculas funcionalmente otimizadas. Em nossos trabalhos anteriores, vimos que os compostos (-)-Guaiol e piperina apresentam efeito leishmanicida para a espécie de *L. amazonensis*. Aqui estudamos um derivado sintético de piperina N4-cyclohexyl-1,2,4-triazol-3-thione (AF2) associado a uma molécula de protoconazol com ação na enzima CYP51 em *Leishmania*. Nossos dados mostraram que (-)-Guaiol e piperina (AF1) apresentaram ação leishmanicida em formas promastigotas de *L. amazonensis* com IC₅₀ de 56.24 µM e 9.36 µM, respectivamente, confirmando achados anteriores do grupo. O composto N4-cyclohexyl-1,2,4-triazol-3-thione (AF2) testado pela primeira vez em *Leishmania amazonensis* apresentou um IC₅₀ de 8.73 µM. Nossa grupo, já havia testado (-)-Guaiol em formas amastigotas parasitos *L. amazonensis* com um IC₅₀= 0.01 µg/mL-1 (44.9 nM). Em formas promastigotas 50 µg/mL (224.85 µM) de (-)-Guaiol levou a alterações estruturais com projeções na membrana mitocondrial do parasito e acúmulo de corpúsculos lipídicos porém não havíamos identificado o IC₅₀ para essas formas celulares (Garcia et al., 2018). Os resultados indicam que formas amastigotas possam ser mais sensíveis a ação do composto evidenciado pela concentração inibitória, o que é interessante, já que são as formas encontradas dentro do hospedeiro invertebrado e

responsáveis pela manutenção da doença (Sasidharan; Saudagar, 2021). Piperina também apresentou citotoxicidade com um IC_{50} de 14.2 μM para promastigotas e 28 μM para amastigotas de *L. amazonensis* observadas por contagem em câmera de Neubauer. A piperina assim como em (-)-Guaiol, atua na mitocôndria com rompimento da membrana e perda de potencial mitocondrial (Ferreira et al., 2011). Os resultados da possível ação do composto nessa organela pode explicar o valor menor da concentração inibitória encontrado nesse estudo em comparação ao estudo anterior com a análise por contagem de parasito viável. AF2 se mostrou o mais eficiente dos compostos como menor IC_{50} para formas promastigotas do parasito. Franklim e colaboradores (2013) previamente observaram atividade tripanocida de AF2 em cepas Y de *Trypanosoma cruzi*, com $IC_{50}=18.3 \mu M$ e 8.87 μM para epimastigotas e amastigotas respectivamente, mostrando que a combinação com o inibidor de CYP51 pode gerar um potente candidato a fármaco.

Nenhum dos compostos demonstraram perda de viabilidade celular abaixo de 70% para nenhuma das linhagens testadas em concentrações até 100 μM em concordância com dados anteriores do nosso grupo para células primárias (Ferreira et al., 2011; Garcia et al., 2018). Outros trabalhos também mostraram que na presença de piperina a viabilidade celular permanece acima de 80% para linfócitos T e B tratados com concentrações até 10 $\mu g/mL$ [35 μM] de piperina por 48h através do teste de MTT (Sharma et al., 2014). Contrariamente, Chuchawankul; Khorana; Poovorawan (2012) observaram que piperina diminui a proliferação celular em PBMC a partir de 10 $\mu g/mL$ [35 μM] em 24, 48 e 72h, mas as células ainda se mostravam viáveis (71.43%) na concentração de 100 $\mu g/mL$ (350 μM) mesmo após 96h. Doucette e colaboradores (2015) observaram que o tratamento com piperina [100 μM] antes do estímulo com anti-CD3 e anti-CD28-coated Dynabeads® ou ovoalbumina (OVA) levou a redução da proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ sem apresentar citotoxicidade para a células. Nós observamos que em 50 μM ainda se encontrava 90% dos macrófagos de linhagem celular viáveis e como mencionado acima, piperina demonstra poder ser um composto seguro uma vez que mesmo em concentrações elevadas ainda é possível encontrar viabilidade celular acima de 70%.

O sesquiterpeno (-)-Guaiol pode apresentar atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* associada a formação de autofagossomos como observado em linhagens de células tumorais de pulmão em concentrações maiores de 100 μM ($IC_{50} = 121.7 \mu M$ e 211.5 μM) (Yang et al., 2016, 2018, 2022). Zeng e colaboradores (2022) apesar de corroborar com

os dados, encontraram valores menores com $IC_{50}= 75.7 \mu M$ e $92.1 \mu M$. Já o trabalho de Hong e colaboradores (2023) demonstrou que o (-)-Guaiol não foi tóxico para células RAW 264.7 até $100 \mu M$ após 48h de tratamento corroborando com nossos resultados. Células imortalizadas perderam suas características primordiais devido a mutações que permitem a sua divisão contínua. Já células extraídas de organismos e cultivadas em laboratório são ainda que em ambientes controlados e fora de um sistema, o mais próximo ao encontrado *in vivo*. Apesar das linhagens celulares serem mais resistentes a fármacos, ainda são utilizados como modelos de estudo pela sua fácil manutenção, acesso e reproduzibilidade (Breslin; O'driscoll, 2013; Freshney, 2011).

As linhagens celulares são muito utilizadas na pesquisa em diversos modelos, entre eles na testagem de compostos, que possam ser potenciais fármacos para averiguar toxicidade e estudar mecanismos de ação. Diferentes linhagens celulares apresentam características únicas entre si, seja pela sua espécie animal e/ou tecido de origem ou pelas mutações que possuem. Elas são úteis para entender os processos biológicos, que possam ser ativados e/ou alterados. O cultivo celular permite um ambiente de maior controle das variáveis dos testes, uma reproduzibilidade que resulta em dados mais homogêneos funcionando com um primeiro gargalo de moléculas promissoras. Nossa grupo trabalhou com as linhagens celulares murinas RAW 264.7 e canina DH82 e observamos que ambas apresentam diferentes perfis de infecção por espécie de *L. amazonensis* e *L. infantum* e se diferem também na produção de NO, ROS, ação de fagocitose, expressão de moléculas MHC e co-estimulatórias e produção de citocinas (Nadaes et al., 2020). Sendo assim, nesse trabalho nos propusemos a investigar a capacidade imunomodulatória de compostos naturais identificados pelo nosso grupo como leishmanicida (Ferreira et al., 2011; Garcia et al., 2018) em linhagens murinas RAW 264.7 e P388D1 e canina DH82 estimulados ou não com LPS e infectados ou não com *L. amazonensis* para averiguar a performance dos diferentes compostos nas diferentes linhagens celulares. Nossos dados mostraram que o tratamento com AF2 diminuiu a fagocitose de promastigotas de *L. amazonensis* por células caninas DH82, porém essa atividade não foi observada em macrófagos RAW264.7. Estudos posteriores podem averiguar se esse efeito influencia na atividade leishmanicida na célula canina. Nos tratamentos com (-)-Guaiol e AF1 e na linhagem celular murina RAW 264.7 não houve diferença na atividade fagocítica em relação ao controle. Anteriormente nosso grupo mostrou que o tratamento com óleo essencial de *Aloysia gratíssima*, que apresentou o (-)-Guaiol como composto majoritário, aumentou a

fagocitose de promastigotas por macrófagos peritoneais de camundongo. Os resultados desses estudos sugerem que esse efeito pode não estar relacionado ao seu composto majoritário, podendo ser de outros constituintes presentes do OE de *Aloysia gratíssima* (Garcia et al., 2018). O resultado encontrado da influência da piperina na fagocitose das linhagens de macrófagos celulares RAW264.7 e DH82, vão de encontro aos dados observados em macrófagos peritoneais de camundongos desafiados com *L. amazonensis* (Ferreira et al., 2011).

A produção de moléculas microbicidas como o NO e ROS são consequência da ativação da célula diante a um estímulo. O LPS é utilizado em testes de NO e ROS por induzir uma resposta pro-inflamatória e produção dessas moléculas (Atri; Guerfali; Laouini, 2018; Murphy, 2014, p. 76-82; Yunna et al., 2020). Em nosso estudo comparando RAW 264.7 e DH82 na infecção por *L. amazonensis* e *L. infantum*, observamos que células caninas DH82 em repouso produzem uma alta concentração de arginina e que essas células podem apresentar um perfil de macrófagos M2 (Nadaes et al., 2020). Ao utilizar a concentração de 1 μ g/mL de LPS, não foi possível detectar aumento na produção de NO por citometria com 24h de cultivo. Nesse estudo, utilizando a mesma concentração, porém com um tempo maior (48h) conseguimos detectar a produção de NO nas células com a sonda intracelular DAF-FM que é capaz de detectar NO a partir de ~3 nM. Em linhagem celular P388D1 foi necessário utilizar concentrações superiores de LPS [10 μ g/mL] para detecção de NO nas células. Nesse trabalho, a linhagem celular RAW 264.7 apresentou a maior produção de NO, enquanto P388D1 apresentou a menor produção entre as 3 linhagens estudadas. Stuchr; Marietta (1987) ao analisar o produção de nitrito (NO₂⁻)/nitrato(NO₃⁻) em diferentes linhagens celulares de macrófagos (PU5-1.8, WEHI-3, RAW 264.7 e P388D1) e macrófagos peritoneais (C3H/He e C3H/HeJ) com diferentes concentrações de LPS [0.001, 0.1, 1 e 50 μ g/mL] e INF- γ [10, 100, 1000 e 10000 U/mL] ou de micro-organismos e seus componentes (BCG heat killed, componentes antigênicos de bactéria PPD, MDP e de fungo zymosan e DS) observou que P388D1 não consegue produzir NO após nenhum dos desafios testados mesmo nas concentrações mais elevadas. O autor só conseguiu detectar a produção das moléculas em P388D1 quando estimulou com 1 μ g/mL de LPS + 500 U/mL de INF- γ , com sobrenadantes de cultura de esplenócitos extraídos de camundongos desafiados com BCG (LK – linfocinas) e com LPS+LK. Nos desafios de LPS + INF- γ e LPS+LK, P388D1 foi a linhagem celular que menos produziu NO assim como observado no nosso

trabalho. Enquanto RAW 264.7 atinge um platô de produção após 1 μ g/mL de LPS e responde ao máximo com 10 U/mL de INF- γ . Interessante é que, apesar das células RAW 264.7 perderem significativamente sua viabilidade (10% de células viáveis) após estímulo com LPS, a cultura P388D1 se mantém com 95% das células vivas (Stuchr; Marietta, 1987). No trabalho de Weber e colaboradores (2023), a linhagem celular P388D1 estimulada com 200 ng/mL de PMA aumentou em 5x sua produção de NO, porém em um tempo maior de exposição (72h) do que no nosso trabalho e detectado por Griess. Śmiałek e colaboradores (2022) observaram que culturas RAW 264.7 após 6h de estímulo com LPS (100ng/mL) e LPS+INF γ (100ng/mL + 10ng/mL) tiveram um aumento na produção de NO e da expressão de mRNA de iNOS maior que em culturas P388D1 o que poderia explicar a diferença de ativação de ambas as linhagens murinas.

Macrófagos RAW 264.7 em repouso não tiveram sua produção de NO alterada após tratamento com os compostos. Por outro lado, em células estimuladas com LPS e tratadas com os compostos houve aumento na produção de NO. Da mesma forma, o aumento da produção é visto em linhagem celular P388D1 estimuladas com LPS e tratada com AF2 enquanto que (-)-Guaiol diminuiu a produção de NO nestas células. Recentemente, foi demonstrado que células RAW 264.7 pré-tratadas com (-)-Guaiol por 1h e depois estimuladas com 100 ng/mL de LPS por 48h, levaram a uma diminuição de produção de NO na concentração de 100 μ M do composto, o que não foi observado nas concentrações de 1 e 10 μ M (Hong et al., 2023). Células RAW 264.7 como vimos aqui e em outros trabalhos conseguem ser ativada com LPS, o efeito do (-)-Guaiol observado nos nossos resultados pode ser devido a concentração testada que pode não ser a ideal para inibir a produção de NO após estímulo por LPS. O que foi possível em P388D1 com o tratamento de 60 μ M do composto.

Piperina (AF1) [50 μ M] levou a redução de 39% da concentração de NO em macrófagos peritoneais estimulados com LPS após 48h de tratamento (Ferreira et al., 2011). Efeito também observado em Duan e colaboradores (2022) onde o pré-tratamento com 10 e 20 mg/L de piperina (10 μ g/mL e 20 μ g/mL ou 35 e 70 μ M) por 2h em células RAW 264.7 estimuladas com 500 μ g/L de LPS por 24h diminuíram sua produção de NO. Contudo, piperina apesar de sabidamente ter atividade anti-inflamatória e antioxidante já foi observado aumento na produção de NO em macrófagos peritoneais estimulados com 1 μ g/mL de LPS e tratados com 1 [3.5 μ M] e 10 μ g/mL [35 μ M] por 48h. O tratamento com 3.5 μ M induziu uma produção maior de NO que o tratamento com 35 μ M dosado

pelo método de Griess (Sharma et al., 2014). Em nosso trabalho, células de linhagem RAW 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com piperina [50 μ M] apresentaram um aumento da produção de NO.

Nos macrófagos caninos DH82, podemos observar que em células sem estímulo o composto AF2 aumentou a produção de NO, enquanto (-)-Guaiol diminuiu. Apesar das células estimuladas com LPS e tratadas com AF2 demonstrarem um aumento em relação ao controle, não foi estatisticamente significativo. Em nosso trabalho anterior com células peritoneais, (-)-Guaiol [1 μ g/mL = 4.5 μ M] não alterou a produção de NO em células em repouso ou estimuladas com LPS após tratamento (Garcia et al., 2018). A produção de NO nesta célula é bem discutida, só conseguimos dosar a molécula através do uso de sonda e com quantidade maior do que utilizada para estimular as células murinas RAW264.7. Visto que, pelo método de Griess não foi possível. Mendonça e colaboradores (2017) não detectaram a produção de NO em células DH82 estimuladas com LPS e IFN- γ . Curiosamente, Wasserman e colaboradores (2012) mostraram que células caninas DH82 não estimuladas apresentavam cerca de 90 μ M de nitrito detectado pela reação de Griess, mas as células não responderam quando estimuladas com LPS na concentração de 0,1 à 10 μ g/mL.

Na análise de ROS observamos que as células RAW 264.7 tiveram uma intensidade de fluorescência menor que as linhagens DH82 e P388D1, sendo essa última apresentando uma leitura superior as demais. Em nosso trabalho comparando ambas as linhagens e analisando ROS total e mitocondrial vimos que a DH82 apresenta valores menores de *fold change* em relação a fluorescência e de porcentagem de células fluorescentes (Nadaes et al., 2020). O estímulo com LPS na linhagem RAW 264.7 foi maior do que o utilizado no nosso trabalho anterior [1 μ g/mL] além de um tempo menor para a dosagem dos radicais (24h).

No trabalho de Barbour e colaboradores (1986) eles compararam o estímulo com LPS relacionando com a via do ácido araquidônico em ambas as linhagens murinas RAW 264.7 e P388D1. Mesmo a P388D1 apresentando uma expressão similar de CD11b:CD18 e maior de receptor CD14 (tanto em células em repouso quanto nas estimuladas) em comparação com a RAW 264.7, o desafio com LPS (200 ng/mL – 1h) não levou a metabolização do ácido graxo em P388D1 e o mesmo foi observado estimulando com PMA (30 nM). O autor observa alta concentração da proteína erk2 (componente da MAP quinase) na sua forma ativa em células P388D1 em repouso e sugere que esse estado é

constante nessas células o que levaria a um efeito refratário na resposta por LPS na célula (Barbour et al., 1986). Sabendo-se que a ativação de MAP quinase pode ocorrer via ROS e observando as leituras de fluorescência de ROS por P388D1 pode ser que haja uma relação entre os eventos que pode ser futuramente analisado (Son et al., 2011).

Em células RAW 264.7 em repouso, o tratamento com piperina (AF1) e AF2 levou a um aumento da produção de ROS, enquanto células estimuladas com LPS e tratadas com AF2 diminuíram a produção de ROS. Em células caninas DH82 em repouso o efeito de piperina (AF1) e AF2 se mostrou o oposto, onde o primeiro levou a uma diminuição e o segundo a um aumento da produção de ROS. O tratamento com AF1 em células caninas DH82 estimuladas com LPS também levou a diminuição de ROS enquanto que no tratamento com (-)-Guaiol foi observado um aumento. Em P388D1, (-)-Guaiol e piperina (AF1) diminuíram a produção de ROS em células estimuladas com LPS. Os resultados de DH82 e P388D1 vão de acordo com Kumar; Sharma (2015) que viram que piperina inibiu a produção de ROS induzida por deltametrina na concentração de 10 e 50 μ g/mL (35 e 350 μ M respectivamente) em todos os tempos testados (1, 3 e 6h) tratamento em esplenócitos. O efeito inibitório do composto não aumenta ao longo do período das 6h. O tratamento com 1 μ g/mL levou a diminuição somente a partir de 3h (Kumar; Sharma, 2015). Assim como observado anteriormente por Duan e colaboradores (2022) o pré-tratamento com 10 e 20 mg/L (10 μ g/mL e 20 μ g/mL ou 35 e 70 μ M) de piperina por 2h em células RAW 264.7 seguido de estímulo com LPS (500 μ g/L ou 500 ng/ml) por 24h diminuiu sua produção de ROS, observado por microscópio fluorescente utilizando-se de sonda H2DCFDA (DAF). A diferença dos resultados pode ter sido devido ao tempo de análise que influencia na concentração da molécula, técnica utilizada e/ou pelo alto estímulo usado.

As células apresentadoras de antígenos (APCs) utilizam moléculas de MHC e co-estimulatórias para apresentar antígenos e ativar os linfócitos T virgens (Murphy, 2014, p. 335-382). Em linhagens RAW 264.7, o tratamento com os compostos não modulou a expressão dessas moléculas. Na linhagem celular murina P388D1, a infecção com *L. amazonensis* levou a diminuição da expressão de MHC I, enquanto aumentou a de MHC II. O tratamento com AF2 diminuiu a expressão de MHC I nas células em repouso. Em células infectadas com *L. amazonensis* AF1 levou ao aumento da expressão dessa molécula. O composto AF2 também aumentou a população de células P388D1 MHC II+ em culturas sem estímulo. Ao analisar as células infectadas com *L. amazonensis* é possível

observar um aumento na expressão de MHC II nos tratamentos com AF1 e AF2 enquanto que (-)-Guaiol leva a diminuição. No entanto, os resultados não apresentam diferença estatística. Os dados apontam que a presença da *Leishmania* influencia na expressão da molécula e no efeito do composto. O aumento de MHC II em P388D1 após tratamento com AF2 demonstra, que o composto pode levar a ativação da resposta celular mediada por linfócitos T. No entanto, são necessários mais estudos como a análise da expressão de moléculas co-estimulatórias para aferir a capacidade de apresentação de antígeno e de ativação dessas células frente ao tratamento. Resultados preliminares de DH82 sugerem que os compostos tendem a diminuir a expressão de MHC II tanto em células em repouso, quanto em células ativadas com LPS, o que poderia influenciar negativamente na apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos T. Yang e colaboradores (2022) estudando a atividade antineoplásica de (-)-Guaiol inoculou células LLC em tecido subcutâneo na região do ombro de camundongos C57BL/6 e analisando a imuno-histoquímica do tecido tumoral após tratamento com 100 μ M do composto, foi observado um aumento da expressão de CD11c, MHC II e CD86, o que não observamos nos nossos resultados utilizando a concentração de 50 μ M. Interessante que Bae e colaboradores (2012) mostraram que macrófagos derivados de medula previamente expostos a piperina (1, 5 e 10 μ M) por 1h e depois estimulados com LPS por 24h diminuíram a expressão de MHC II, CD40 e CD86 de forma dose dependente. Soutar e colaboradores (2017) viram que em linfócitos B, piperina (25, 50 e 100 μ M) também inibiu a expressão de MHC II, CD40 e CD86 de forma dose-dependente quando estimulados com anti-CD40+anti-BCR. O autor destacou que a expressão dessas moléculas foi completamente inibida na concentração de 100 μ M e isso se reflete na apresentação de antígenos de albumina para os linfócitos T, que também foi diminuída de forma dose dependente (Soutar et al., 2017). Já Chouhan e colaboradores (2015) viram que piperina [200 mg/kg] aumentou a expressão de CD80 e CD86 em macrófagos peritoneais de animais infectados por *L. donovani*, o que pode levar a apresentação do antígeno do parasito. Em linhagem P388D1 infectada com *L. amazonensis*, piperina (AF1) levou ao aumento na expressão de MHC I de forma significativa. Se o tratamento *in vivo* de camundongos infectados com *L. amazonensis* também pode aumentar a expressão de moléculas MHC e co-estimulatórias é algo a ser investigado futuramente.

Taciak e colaboradores (2018) apontam que pode haver alterações gênicas, de expressão de moléculas, fagocitose e produção de NO nas células conforme o número

crescente de passagens de cultura celulares de RAW 264.7. A exemplo, CD86 aumenta sua expressão a nível de mRNA em passagens p50. Apesar disso não se refletir na expressão da molécula na superfície das células. Nesse trabalho, vimos que RAW 264.7 demonstrou uma alta expressão de CD86 mesmo sem estímulo o que pode estar relacionado aos dados de Taciak, uma vez que no nosso estudo anterior com essa linhagem celular vimos que após estímulo com LPS [1 μ g/mL] as células demonstraram um aumento significativo na expressão da molécula co-estimulatória em relação ao controle. O autor sugere que a cultura RAW 264.7 se mantém estável até a p30 onde a população celular ainda se encontra com características da cultura originária. No trabalho de Heinrich e colaboradores (2015) eles também fazem uma análise na expressão de receptores e moléculas MHC em passagens de linhagem celulares DH82 e constatam do mesmo modo que em passagens maiores as células tendem a perder a expressão de CD11c, CD14, CD18, CD45 e CD80. Culturas celulares demandam sucessivas passagens para sua manutenção no laboratório. O estresse causado pela técnica para obtenção da célula e a constante indução do crescimento celular, pode levar a mudanças significativas tanto genéticas quanto fenotípicas das culturas celulares que já sabidamente possuem mutações. Os dados apresentados nesse trabalho demonstram a importância de assegurar a estabilidade da cultura celular e como isso se reflete na reproduzibilidade dos estudos científicos.

Os compostos diminuíram a expressão de citocinas IL-10 e IL-12 assim como a expressão de TLR4 e TLR9 em células murinas RAW 264.7 e caninas DH82 estimuladas com LPS. No entanto, nas células murinas e caninas sem estímulo, os tratamentos com (-)-Guaiol e AF1 aumentaram a produção de IL-10. Já o (-)-Guaiol e AF1 diminuíram a expressão de TLR4 em P388D1 em repouso. Nossos dados vão em acordo com Bae e colaboradores (2012) que observa que células BMDC pré-tratadas com piperina (5 e 10 μ M) e estimuladas com 500 ng/mL de LPS na presença do composto diminuem a sua produção de IL-12. Assim como os dados de Soutar e colaboradores (2017), onde linfócitos B previamente estimulados e co-cultivados com linfócitos T ao serem novamente colocadas na presença de LPS+anti-CD40 e anti-BCR + 100 μ M da piperina diminuíram sua produção de IL-10. De forma contrária, o pré-tratamento com 10 e 20 mg/L de piperina (10 μ g/mL e 20 μ g/mL ou 35 e 70 μ M) por 2h em células RAW 264.7 estimuladas com 500 μ g/L (500 ng/ml) de LPS aumentaram a produção de IL-10 sendo o efeito mais expressivo na concentração mais elevada onde houve aumento de 196% da

citocina no sobrenadante e 136% da expressão gênica em relação ao LPS (Duan et al., 2022).

Bacellar e colaboradores (2002) viram que PBMC's isolados de pacientes com leishmaniose mucocutânea secretam e expressam mais citocinas INF- γ , TNF- α e IL-5 e produzem menos IL-10 que de pacientes CL. O autor revela ainda que a fonte de produção de INF- γ são os linfócitos T CD4, enquanto TNF- α provém de macrófagos e T CD4. A produção de IL-10 induzida pelos compostos assim como a redução de citocinas pro-inflamatória como IL-12 e moléculas reativas ROS e NO pode ser interessante para o tratamento da leishmaniose mucocutânea, onde se tem uma resposta exacerbada, com consequente lesão tecidual. Por outro lado, a produção de ROS e NO em DH82, uma célula com perfil M2 e que sabidamente produz mais arginina, e P388D1, que não responde ao LPS de maneira satisfatória, indica que compostos como AF2 podem estimular essas células a um perfil mais inflamatório. Isso reitera a importância de mais estudos com esse composto.

Estudos em relação a participação dos receptores semelhantes a Toll na infecção por *Leishmania sp.* demonstram que eles podem tanto ajudar na ativação da célula contra o parasito, como em outros casos contribuir para o quadro clínico do paciente. Isso está relacionado a complexa relação de qual receptor Toll será ativado, em qual célula e qual espécie de *Leishmania* está presente na infecção (Faria; Reis; Lima, 2012). A exemplo do receptor TLR4 que é importante para a produção de TNF- α e eliminação do parasito em macrófagos infectados por *L. panamensis* (Gallego et al., 2011). Já no estudo de Carneiro e colaboradores (2021) utilizando PBMC's de pacientes com leishmaniose cutânea infectados por *L. braziliensis* e de pacientes saudáveis, eles observaram que quando infectam as células com o parasito ambas as células expressam altos níveis de TLR4 e TLR2 sendo o primeiro mais evidente. Quando o autor neutraliza a ação dos dois receptores (anti-TLR2 e TLR4) nas células de ambos os pacientes e infecta novamente com *L. braziliensis*, ele vê uma diminuição das células infectadas tal qual de parasitos internalizados e da viabilidade dos mesmos. O bloqueio dos receptores diminui a produção de produtos oxidativos, TNF- α , IL-1 β e CXCL9 nas células. Interessante que, quando o autor neutraliza os receptores em amostra de biopsia dos pacientes também vê diminuição de TNF- α e IL-1 β , o que ele discute que pode ajudar no quadro clínico impedindo uma resposta exacerbada local associada com o desenvolvimento da lesão (Carneiro et al., 2021). Em Sauter e colaboradores (2019) o autor observar que a ativação

endossomal de TLR9/MyD88/TRIF por *L. amazonensis* leva a expressão de CD200, inibição da produção de NO e que isso favorece a infecção. Por outro lado, em camundongos TLR9^{-/-} a infecção por *L. major* leva a lesões maiores e com uma carga parasitária maior do que nos camundongos selvagens (Liese; Schleicher; Bogdan, 2007). Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a diminuição da expressão dos receptores Toll promovidas pelos compostos podem ser favoráveis em infecções por determinadas espécies de *Leishmania*.

Os resultados apresentados apontam que as diferentes linhagens de macrófagos têm características particulares e intrínsecas e que isso deve ser levado em consideração no estudo de potenciais moléculas, pois o mesmo composto pode atuar de maneira distinta nas diversas populações celulares. Igualmente importante, é a escolha do modelo celular de acordo com a proposta de estudo, a exemplo as linhagens aqui analisadas que apresentaram perfis diferentes de ativação frente ao estímulo com LPS. Os compostos naturais aqui estudados demonstraram atividades biológicas, que divergem de alguns dados encontrado em literatura. No entanto, buscamos analisar a ação desses compostos após um quadro infeccioso e não como um pré-tratamento como é proposto em alguns estudos. Apesar disso, esses produtos demonstraram um desempenho promissor como produtos bioativos. O composto AF2, inicialmente idealizado com um mecanismo de ação direcionado a atividade leishmanicida, se mostrou capaz de atuar também na célula hospedeira. Os compostos demonstraram ter a capacidade de modular a resposta de macrófagos e isso pode influenciar na resolução da leishmaniose, sugerindo que eles podem ser possíveis candidatos de interesse farmacológico. Assim como podem ser explorados em outros modelos de doenças inflamatórias. Os dados aqui apresentados contribuem para o conhecimento das diferentes linhagens celulares P388D1, RAW 264.7 e DH82 e permite um direcionamento para futuros projetos com células primárias e posteriormente modelos animais.

7 CONCLUSÃO

Os compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2 conseguem modular os macrófagos alterando a produção de produtos microbicidas NO e ROS, a expressão de moléculas MHC I/II e co-estimulatórias CD80 e CD86 e a expressão de citocinas (IL-10, IL-12 e IL-1 β) e de receptores toll (TLR4 e TLR9) indicando que esses produtos podem influenciar na resposta a diferentes infecções. As linhagens celulares P388D1, RAW 264.7 e DH82 apresentam diferentes perfis de ativação relacionado as suas características celulares.

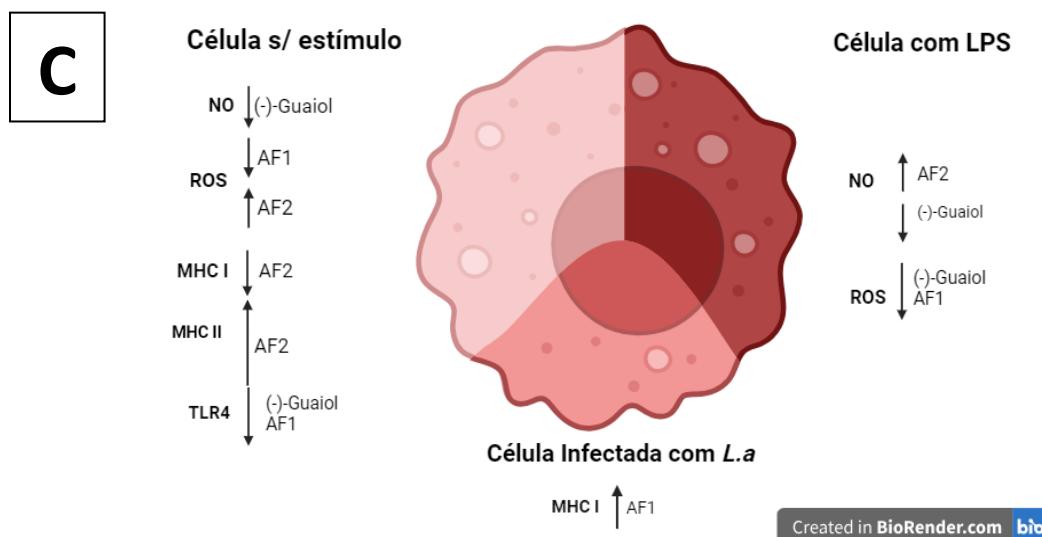
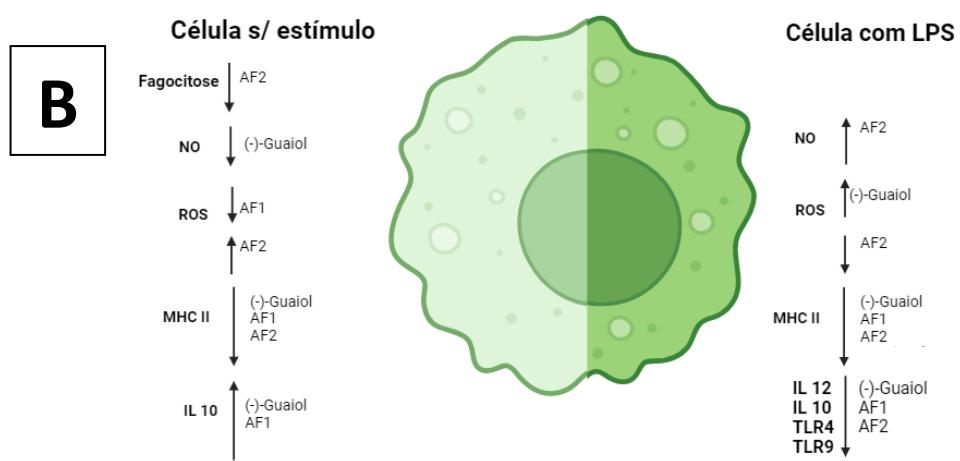
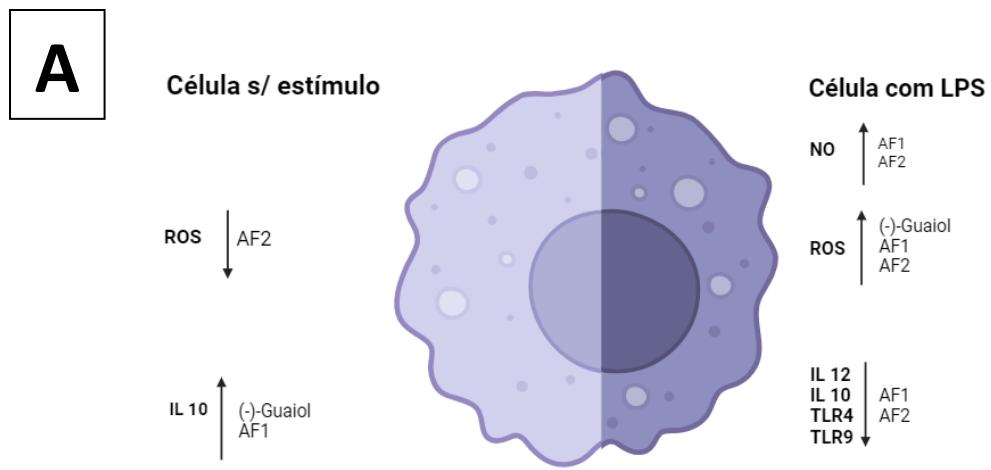


Figura 17. Ação imunomoduladora dos compostos (-)-Guaiol, AF1 e AF2 em linhagens celulares murinas e caninas. RAW 264.7 (A), DH82 (B) e P388D1 (C).

8 BIBLIOGRAFIA

- ALIJAR SOUZA, M. et al. Biological Properties of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. (Verbenaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.
- ALVAR, J.; YACTAYO, Sergio; BERN, Caryn. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, 2006.
- APEL, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Myrciaria tenella* and *Calycorectes sellowianus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 433–438, 2010.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUIINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.
- BAE, G. S. et al. Piperine Inhibits Lipopolysaccharide-induced Maturation of Bone-marrow-derived Dendritic Cells Through Inhibition of ERK and JNK Activation. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 12, p. 1893–1897, 2012.
- BARBOUR, S. E. et al. Mature macrophage cell lines exhibit variable responses to LPS. **Molecular immunology**, v. 35, n. 14-15, p. 977-987, 1998.
- BARNES, A. et al. Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 75, n. 1–2, p. 9–25, 2000.
- BAUER, S. R. et al. Clonal relationship of the lymphoblastic cell line P388 to the macrophage cell line P388D1 as evidenced by immunoglobulin gene rearrangements and expression of cell surface antigens. **The Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 136, n. 12, p. 4695–4699, 1986.
- BERGHAUS, L. J. et al. Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 33, n. 5, p. 443–454, 2010.
- BERTRAND, J. Y. et al. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3004–3011, 2005.
- BOISSET, J. C. et al. *In vivo* imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 116–120, 2010.
- BOUVIER, G.. et al. Relationship between phagosome acidification, phagosome-lysosome fusion, and mechanism of particle ingestion. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, n. 6, p. 729-734, 1994.
- BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5-6, p. 240-249, 2013.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**. v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CARNEIRO, P. P. et al. Blockade of TLR2 and TLR4 Attenuates Inflammatory Response and Parasite Load in Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 706510, 2021.

CARVALHO, J. P. et al. Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. 1–9, 2021.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications Biology**. Nature Research, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Leishmaniasis**. 14 dezembro de 2017. Disponível em > <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> Acesso em: 17 novembro de 2023.

CHAMBERLAIN, L. M. et al. Phenotypic non-equivalence of murine (monocyte-) macrophage cells in biomaterial and inflammatory models. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 88, n. 4, p. 858–871, 2009.

CHOI, D. W. et al. Piperine Ameliorates Trimellitic Anhydride-Induced Atopic Dermatitis-Like Symptoms by Suppressing Th2-Mediated Immune Responses via Inhibition of STAT6 Phosphorylation. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2186, 2020.

CHRISTENSEN, J. L. et al. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. **PLoS Biology**, v. 2, n. 3, p. e75, 2004.

CHUCHAWANKUL, S.; KHORANA, N.; POOVORAWAN, Y. Piperine inhibits cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 1, p. 617–627, 2012.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F. N. *Leishmania* Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A.**, v. 9, p. 330, 2019.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 2022.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DICK, S. A. et al. Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles **Science immunology**, v. 7, n. 67, p. eabf7777, 2022. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

DOUCETTE, C. D. et al. Piperine From Black Pepper Inhibits Activation-Induced Proliferation and Effector Function of T Lymphocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 11, p. 2577–2588, 2015.

DUAN, Z. et al. Piperine Derived from *Piper nigrum L.* Inhibits LPS-Induced Inflammatory through the MAPK and NF-κB Signalling Pathways in RAW264.7 Cells. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 2990, 2022.

EKIERT, H. M.; SZOPA, A. Biological activities of natural products. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5769, 2020.

FAMPA, P. et al. Anti-*Leishmania* Effects of Volatile Oils and Their Isolates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 561-578, 2021.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-like receptors in *Leishmania* infections: Guardians or promoters?. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

FENG, X. et al. Effects of Piperine on the Intestinal Permeability and Pharmacokinetics of Linarin in Rats. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 5624-5633, 2014.

FERREIRA, C. et al. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 17, p. 2155–2164, 2011.

FRANKLIM, T. N. et al. Design, Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Novel 1,2,4-Triazoles-3-thiones Derived from Natural Piperine. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6366-6382, 2013.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications: Sixth Edition**. John Wiley & Sons, 2011.

FUJIMOTO, Y. et al. Adenosine and ATP affect LPS-Induced cytokine production in canine macrophage cell line DH82 Cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 1, p. 27–34, 2012.

GALLEGO, C. et al. Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2871–2879, 2011.

GARCIA, M. C. F. et al. The *in vitro* antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1219–1227, 2018.

GINHOUX, F. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841–845, 2010.

RUIZ-POSTIGO J. A. et al. Global leishmaniasis surveillance: 2021, assessing the impact of the COVID-19 pandemic. **Weekly Epidemiological Record**, n. 45, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9745-575-590>>. Acesso em: 14 jun. 2023.

GORDON, S. Elie Metchnikoff, the Man and the Myth. **Journal of Innate Immunity**, v. 8, n. 3, p. 223-227, 2016.

GRONE, A. et al. RT-PCR Amplification of Various Canine Cytokines and So-called House-keeping Genes in a Species-Specific Macrophage Cell Line (DHS2) and Canine Peripheral Blood Leukocytes. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 46, n. 5, p. 301-310, 1999.

HAQ, I. U. et al. Piperine: A review of its biological effects. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 2, p. 680-700, 2021.

HEINRICH, F. et al. Passage-dependent morphological and phenotypical changes of a canine histiocytic sarcoma cell line (DH82 cells). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 1-2, p. 86-92, 2015.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology Research**, v. 118, p. 2743-2752, 2019.

Henrietta Lacks: science must right a historical wrong. **Nature**, v. 585, n. 7823, p. 7, 2020.

HOEFFEL, G. et al. C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 665-678, 2015.

HONG, Y. H. et al. Anti-Inflammatory and T-Cell Immunomodulatory Effects of Banana Peel Extracts and Selected Bioactive Components in LPS-Challenged *in vitro* and *in vivo* Models. **Agriculture (Switzerland)**, v. 13, n. 2, p. 451, 2023.

HOUSE, A. K.; GREGORY, S. P.; CATCHPOLE, B. Pattern-recognition receptor mRNA expression and function in canine monocyte/macrophages and relevance to canine anal furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, n. 3-4, p. 230-240, 2008.

I. LEPESHEVA, G.; R. WATERMAN, M. Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2060-2071, 2011.

JANTAN, I.; AHMAD, W.; BUKHARI, S. N. A. Plant-derived immunomodulators: An insight on their preclinical evaluation and clinical trials. **Frontiers in Plant Science**. **Frontiers Research Foundation**, v. 6, p. 655, 2015.

JEDRZEJCZAK-SILICKA, M. History of Cell Culture. **New Insights into Cell Culture Technology**, v. 1, p. 13, 2017.

JIN, Z. H. et al. Enhancement of oral bioavailability and immune response of Ginsenoside Rh2 by co-administration with piperine. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 16, n. 2, p. 143-149, 2018.

KAUFMANN, S. H. E. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 705-712, 2008.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: Influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 224-231, 2002.

KOREN, H. S.; HANDWERGER, B. S.; WUNDERLICH, J. R. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. **The Journal of Immunology**, v. 114, n. 2, p. 894-897, 1975.

KUMAR, A.; SASMAL, D.; SHARMA, N. Immunomodulatory role of piperine in deltamethrin induced thymic apoptosis and altered immune functions. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 504–514, 2015.

KUMAR, A.; SHARMA, N. Comparative efficacy of piperine and curcumin in deltamethrin induced splenic apoptosis and altered immune functions. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 119, n. 1, p. 16–27, 2015.

KUMARAVELU, P. et al. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-agonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. **Development**, v. 129, n. 21, p. 4891–4899, 2002.

LENDECKEL, U.; VENZ, S.; WOLKE, C. Macrophages: shapes and functions. **ChemTexts**, v. 8, n. 2, p. 12, 2022.

LEPESHEVA, G. I.; FRIGGERI, L.; WATERMAN, M. R. CYP51 as drug targets for fungi and protozoan parasites: past, present and future. **Parasitology**, v. 145, n. 14, p. 1820 -1836, 2018.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 12, p. 3424–3434, 2007.

LIN, C. et al. Extracellular ATP induces CD44 shedding from macrophage-like P388D1 cells via the P2X7 receptor. **Hematological Oncology**, v. 30, n. 2, p. 70–75, 2012.

LIU, Z. et al. Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. **Cell**, v. 178, n. 6, p. 1509- 1525.e19, 2019.

MAEDA, J. et al. Intrinsic radiosensitivity and cellular characterization of 27 canine cancer cell lines. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0156689, 2016.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M. et al. *Leishmania* Hijacks myeloid cells for immune escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 883, 2018.

MASS, E. Delineating the origins, developmental programs and homeostatic functions of tissue-resident macrophages. **International Immunology**, v. 30, n. 11, p. 493-501, 2018.

MASS, E. et al. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-17, 2023.

MCGRATH, K. E. et al. Distinct Sources of Hematopoietic Progenitors Emerge before HSCs and Provide Functional Blood Cells in the Mammalian Embryo. **Cell Reports**, v. 11, n. 12, p. 1892–1904, 2015.

MEDVINSKY, A.; DZIERZAK, E. Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 897-906, 1996.

MEHROTRA, P.; RAVICHANDRAN, K. S. Drugging the efferocytosis process: concepts and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 8, p. 601-620, 2022.

MENDONÇA, P. H. B. et al. Canine macrophage DH82 cell line as a model to study susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 604, 2017.

MONTANER-ANGOITI, E.; LLOBAT, L. Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world?. **Veterinary Research Communications. Springer Science and Business Media B.V**, p. 1-23, 2023.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway 8^a edição (Em Português do Brasil)**. Editora Artmed, 2014.

NADAES, N. R. et al. DH82 Canine and RAW264.7 Murine Macrophage Cell Lines Display Distinct Activation Profiles Upon Interaction With *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 247, 2020.

NAKANISHI-MATSUI, M. et al. Lipopolysaccharide induces multinuclear cell from RAW264.7 line with increased phagocytosis activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 2, p. 144–149, 2012.

NEWMAN, D. J. Natural products and drug discovery. **National Science Review**, v. 9, n. 11, 2022.

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

PALIS, J. et al. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. **Development**, v. 126, n. 22, p. 5073–5084, 1999.

PAN, H. et al. Piperine metabolically regulates peritoneal resident macrophages to potentiate their functions against bacterial infection. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 32468, 2015.

PARK, M. D. et al. Macrophages in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 23, p. 4259-4279, 2022.

PRESTIDGE, R. L. et al. Interleukin 1: Production By P388d1 Cells Attached To Microcarrier Beads. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, n. 2, p. 197-204, 1981

QUIJIA, C. R.; ARAUJO, V. H.; CHORILLI, M. Piperine: Chemical, biological and nanotechnological applications. **Acta Pharmaceutica**, v. 71, n. 2, p. 185–213, 2021.

RAMSEY, J. T. et al. Essential Oils and Health. **Yale Journal of Biology And Medicine**, v. 93, n. 2, p. 291, 2020.

RASCHKE, W. C. et al. Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261-267, 1978.

REN, S. et al. Targeting P2X 7 receptor inhibits the metastasis of murine P388D1 lymphoid neoplasm cells to lymph nodes. **Cell Biology International**, v. 34, n. 12, p. 1205–1211, 2010.

RODRIGUES, O. R. et al. H-2 complex influences cytokine gene expression in *Leishmania infantum*-infected macrophages. **Cellular Immunology**, v. 243, n. 2, p. 118–126, 2006.

SAKAGAMI, H. et al. Cell Death Induced by Nutritional Starvation in Mouse Macrophage-like RAW264.7 Cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 1, p. 343-347, 2009.

SANTANA, R. C. et al. *In vitro* leishmanicidal activity of monoterpenes present in two species of Protium (Burseraceae) on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, p. 112981, 2020.

SAQIB, U. et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937, 2018.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, 2021.

SAUTER, I. P. et al. TLR9/MyD88/TRIF signaling activates host immune inhibitory CD200 in *Leishmania* infection. **JCI Insight**, v. 4, n. 10, 2019.

SERAFIM, T. D. et al. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology Elsevier Ltd**, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021.

SHARMA, S. et al. Protective efficacy of piperine against *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 94, n. 4, p. 389–396, 2014.

SKLOOT, Rebecca. A vida imortal de Henrietta Lacks. Editora Companhia das Letras, 2011.

ŚMIAŁEK, J. et al. Bacteriocin BacSp222 and Its Succinylated Forms Exhibit Proinflammatory Activities Toward Innate Immune Cells. **Journal of Inflammation Research**, v. 15, p. 4601–4621, 2022.

SON, Y. et al. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?. **Journal of Signal Transduction**, v. 2011, p. 1–6, 2011.

SOUTAR, D. A. et al. Piperine, a Pungent Alkaloid from Black Pepper, Inhibits B Lymphocyte Activation and Effector Functions. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 3, p. 466–474, 2017.

SOUZA, M. A. et al. Supercritical CO₂ extraction of *Aloysia gratissima* leaves and evaluation of anti-inflammatory activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 159, p. 104753, 2020.

STUCHR, D. J.; MARIETTA, M. A. Synthesis of Nitrite and Nitrate in Murine Macrophage Cell Lines. **Cancer Research**, v. 47, n. 21, p. 5590-5594, 1987. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/47/21/5590/2429010/cr0470215590.pdf>>.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Studies on the *in vitro* absorption of spice principles – Curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 8, p. 1437–1442, 2007.

SURESH, D. V. et al. Binding of bioactive phytochemical piperine with human serum albumin: a spectrofluorometric study. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 86, n. 4, p. 265–275, 2007.

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

TAKAHASHI, K.; YAMAMURA, F.; NAITO, M. Differentiation, Maturation, and Proliferation of Macrophages in the Mouse Yolk Sac: A Light-Microscopic, Enzyme-Cytochemical, Immunohistochemical, and Ultrastructural Study. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 45, n. 2, p. 87-96, 1989.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 2018.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., v. 11, p. 1066, 2020.

VALÉRIO-BOLAS, A. et al. Intracellular and extracellular effector activity of mouse neutrophils in response to cutaneous and visceral *Leishmania* parasites. **Cellular Immunology**, v. 335, p. 76–84, 2019.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The Origin And Kinetics Of Mononuclear Phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 128, n. 3, p. 415–435, 1968.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunologic Research**, v. 41, p. 15-25, 2008.

WASSERMAN, J. et al. Suppression of canine myeloid cells by soluble factors from cultured canine tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1–2, p. 420–430, 2012.

WEBER, J. I. et al. Insights on Host–Parasite Immunomodulation Mediated by Extracellular Vesicles of Cutaneous *Leishmania shawi* and *Leishmania guyanensis*. **Cells**, v. 12, n. 8, p. 1101, 2023.

WELLMAN, M. L. et al. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24, n. 3, p. 223–229, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. 12 de Janeiro de 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acessado em: 17/11/2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. [2023] Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acessado em: 17/11/2023.

WU, Y.; HIRSCHI, K. K. Tissue-Resident Macrophage Development and Function. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** **Frontiers Media S.A.**, v. 8, p. 617879, 2021.

YANG, Q. et al. (–)-Guaiol regulates RAD51 stability via autophagy to induce cell apoptosis in non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 62585, 2016.

YANG, X. et al. (–)-Guaiol regulates autophagic cell death depending on mTOR signaling in NSCLC. **Cancer Biology and Therapy**, v. 19, n. 8, p. 706–714, 2018.

YANG, X. et al. (–)-Guaiol triggers immunogenic cell death and inhibits tumor growth in non-small cell lung cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 478, n. 7, p. 1611-1620, 2022.

YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology** **Elsevier B.V.**, v. 877, p. 173090, 2020.

ZAHEER, A. et al. Diminished Cytokine And Chemokine Expression In The Central Nervous System Of Gmf-Deficient Mice With Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Brain research**, v. 1144, p. 239-247, 2007.

ZENG, Y. et al. Integrating Network Pharmacology, Molecular Docking, and Experimental Validation to Investigate the Mechanism of (–)-Guaiol Against Lung Adenocarcinoma. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 28, p. e937131-1, 2022.