



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**JOÃO ANTONIO COSTA DE SOUSA**

**EPIISOPILOTURINA DE *Pilocarpus microphyllus* INIBE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS MICROGLIAIS INDUZIDA POR LPS  
INTERFERINDO NA VIA DE SINALIZAÇÃO TLR4/NF- $\kappa$ B-MAPKs**

**FORTALEZA**

**2022**

JOÃO ANTONIO COSTA DE SOUSA

EPIISOPILOTURINA DE *Pilocarpus microphyllus* INIBE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
DE CÉLULAS MICROGLIAIS INDUZIDA POR LPS INTERFERINDO NA VIA DE  
SINALIZAÇÃO TLR4/NF- $\kappa$ B-MAPKs

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: ciências biológicas II.

Orientador: Prof. Dra. Luzia Kalyne Moreira Almeida Leal.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S697e Sousa, João Antonio Costa de.  
Epiisopiloturina de *Pilocarpus microphyllus* inibe a resposta inflamatória de células microglicais induzida por LPS interferindo na via de sinalização TLR4/NF- $\kappa$ B-MAPKs / João Antonio Costa de Sousa. – 2022.  
86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profª. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

1. Jaborandi. 2. epiisopiloturina. 3. neuroinflamação. 4. micróglia. 5. TLR4. I. Título.

CDD 615.1

---

JOÃO ANTONIO COSTA DE SOUSA

EPIISOPILOTURINA DE *Pilocarpus microphyllus* INIBE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA  
DE CÉLULAS MICROGLIAIS INDUZIDA POR LPS INTERFERINDO NA VIA DE  
SINALIZAÇÃO TLR4/NF- $\kappa$ B-MAPKs

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: ciências biológicas II.

Aprovada em: 18/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Vilma de Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

**A Deus.**

**À minha mãe Vera, à minha avó Maria.**

## AGRADECIMENTOS

À força onipotente que nos move, eu chamo de Deus, alguns Oxalá, outros amor, alguns apenas Universo...

À minha mãe Vera Lúcia, pelo amor e apoio incondicional, pelo exemplo de bondade e por ter sido a grande responsável por eu estar aqui.

Ao meu pai Antônio Coelho.

Às minhas irmãs Andréa Marbia e Sarah Isabella, pelo carinho, amor e apoio mútuo.

À minha querida namorada Thaynara Carvalho de Freitas, pelo apoio, carinho, pelos conselhos, por sempre acreditar eu mim e por compartilhar seu amor comigo.

À minha vó Maria Santos, meus sobrinhos e a todo o restante da minha família que torceu por mim.

Ao meu amigo Francisco Vinicius pelos anos de amizade, por toda a ajuda na realização desse trabalho e por sempre demonstrar bondade.

À Ana Bruna, pela ajuda na realização dos experimentos e pela convivência sempre amigável.

À Raysse Mesquita e Rebeca Colares, pela ajuda nos experimentos, por sempre demonstrarem atenção e vontade em aprender. Repassem o conhecimento e ajudem pessoas.

À minha orientadora Prof. Luzia Kalyne, pelos ensinamentos e auxílio técnico na elaboração deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do CEFAC, Lyara Freitas (pelos ensinamentos, pela bondade e pelo bom humor), Talita Rocha, Caroline Sampaio, Talysson Almeida, Elizama Shirley, Francisco Cirineu, Khetyma Fonseca, Emmanuel Vinícius, Jonatas Almeida e a todo o restante dessa equipe, que foi minha casa durante todo esse tempo. Obrigado pelas conversas, conselhos, comidas, risadas e por todo o crescimento pessoal e profissional.

Aos meus queridos amigos que fiz durante a minha jornada da faculdade, pelas conversas, risadas, momentos de descontração e alegria.

A todo o núcleo docente e discente do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, prometo que voltarei em breve para o doutorado.

A todos os membros da banca examinadora, por aceitarem o convite.

Ao CNPq (bolsa sob número de processo 130466/2020-4) e a UFC, pelo apoio financeiro e por ter sido uma casa de sabedoria e amadurecimento.

## RESUMO

A neuroinflamação está presente nos mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças que acometem o sistema nervoso central. Nesse cenário, a micróglia, possui um papel de destaque no início e sustentação do processo inflamatório. A epiisopiloturina (EPIT), alcaloide imidazólico obtido a partir do sub-produto da extração de pilocarpina de *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi), tem se mostrado um fármaco promissor com propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da EPIT sobre a resposta inflamatória de células microgliciais (linhagem BV2) induzida pelo LPS e elucidar o seu possível mecanismo de ação. Inicialmente, avaliou-se de forma preditiva, a probabilidade de EPIT em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) por meio da plataforma online Swiss ADME. A citotoxicidade da EPIT *per se* (3,5; 35; 87,5; 175 e 350  $\mu\text{M}$ ) e sob estimulação do LPS (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), foi avaliada por meio do ensaio da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e do teste do MTT. O efeito desse alcaloide sobre células microgliciais expostas ao LPS (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi investigado pela determinação da concentração de mediadores pró-inflamatórios como o óxido nítrico/nitrito (EPIT: 3,5 - 350  $\mu\text{M}$ ), a IL-1 $\beta$ , IL-6 e o TNF- $\alpha$  (EPIT: 87,5  $\mu\text{M}$ ) e anti-inflamatórios como a IL-10 (EPIT: 87,5  $\mu\text{M}$ ), bem como pela determinação do efeito de EPIT sobre a expressão da enzima iNOS. A análise por western blot foi também empregada para determinar o efeito dessa molécula (EPIT: 87,5  $\mu\text{M}$ ) sobre vias de sinalização pró e anti-inflamatórias, avaliadas pela expressão de receptores transmembranas (TLR4/TREM2), o NF- $\kappa\text{B}$  e as MAPKs (JNK e ERK 1/2). EPIT mostrou alta capacidade em penetrar a BHE, e até a concentração de 350  $\mu\text{M}$  não alterou a atividade da LDH, bem como não interferiu na viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT. O pré-tratamento com EPIT (35; 87,5; 175 e 350  $\mu\text{M}$ ), reduziu significativamente a produção de nitrito e a expressão proteica da enzima iNOS. Em relação a produção de citocinas, EPIT (87,5  $\mu\text{M}$ ) reduziu em até 40 % e 34 % a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , respectivamente, com destaque para seu efeito sobre a concentração de IL-1 $\beta$  (LPS+EPIT:  $57,0 \pm 14,4$   $\text{pg}/\text{mL}$ ) que não diferiu estatisticamente do grupo RPMI/basal ( $44,1 \pm 3,6$   $\text{pg}/\text{mL}$ ). Porém, a EPIT não aumentou a concentração de IL-10 reduzida pelo LPS em células BV2. EPIT inibiu a via de sinalização TLR4/NF- $\kappa\text{B}$ -MAPKs suprimindo a expressão de proteínas fosforiladas, mas não interferiu na expressão do receptor TREM2 em células expostas ao LPS. O estudo determinou, de forma inédita, o efeito anti-inflamatório da EPIT em células microgliciais, que parece estar associado à supressão das cascatas de sinalização do NF- $\kappa\text{B}$  e das MAPKs ao afetar a expressão do receptor TLR4, associado a mecanismos pró-inflamatórios.

**Palavras-chave:** Jaborandi, epiisopiloturina, neuroinflamação, micróglia, TLR4.

## ABSTRACT

### **EPIISOPILOTURIN FROM *Pilocarpus microphyllus* INHIBITS THE INFLAMMATORY RESPONSE OF MICROGLIAL CELLS INDUCED BY LPS INTERFERING IN THE TLR4/NF- $\kappa$ B-MAPKs SIGNALING PATHWAY**

Neuroinflammation is present in the pathophysiological mechanisms of several diseases that affect the central nervous system. In this context, the microglia have a prominent role in initiating and sustaining the inflammatory process. Epiisopiloturine (EPIT), an imidazole alkaloid obtained from the by-product of pilocarpine extraction from *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi), has shown to be a promising drug with anti-inflammatory and antinociceptive properties. Given the above, the present study aimed to investigate the effect of EPIT on the inflammatory response of microglial cells (BV2 cells) induced by LPS and elucidate its possible mechanism of action. Initially, the probability of EPIT to cross the blood-brain barrier (BBB) was evaluated predictively by using the Swiss ADME online platform. The cytotoxicity of EPIT per se (3.5; 35; 87.5; 175 and 350  $\mu$ M) and under LPS stimulation (0.5  $\mu$ g/mL), was evaluated using the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activity assay and by the MTT test. The effect of this alkaloid on microglial cells exposed to LPS (0.5  $\mu$ g/mL) was investigated by determining the concentration of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide/nitrite (EPIT: 3.5 - 350  $\mu$ M), IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (EPIT: 87.5  $\mu$ M) and anti-inflammatory mediators such as IL-10 (EPIT: 87.5  $\mu$ M), as well as by determining the effect of EPIT on iNOS enzyme expression. Western blot analysis was also employed to determine the effect of this molecule (EPIT: 87.5  $\mu$ M) on pro-and anti-inflammatory signaling pathways, evaluated by the expression of transmembrane receptors (TLR4/TREM2), the NF- $\kappa$ B and MAPKs (JNK and ERK 1/2). EPIT showed a high ability to penetrate the BBB, and up to the concentration of 350  $\mu$ M did not alter LDH activity, as well as did not interfere with cell viability assessed by the MTT test. Pretreatment with EPIT (35; 87.5; 175 and 350  $\mu$ M), significantly reduced nitrite production and iNOS enzyme protein expression. Regarding cytokine production, EPIT (87.5  $\mu$ M) reduced IL-6 and TNF- $\alpha$  production by up to 40 % and 34 %, respectively, with emphasis on its effect on IL-1 $\beta$  concentration (LPS+EPIT:  $57.0 \pm 14.4$  pg/mL) that did not differ statistically from the RPMI/basal group ( $44.1 \pm 3.6$  pg/mL). However, EPIT did not increase the concentration of IL-10 reduced by LPS in BV2 cells. EPIT inhibited the TLR4/NF- $\kappa$ B-MAPKs (JNK and ERK1/2) signaling pathway by suppressing the expression of phosphorylated proteins, but did not interfere with TREM2 receptor expression in LPS-exposed cells. The study determined, in a novel way, the anti-inflammatory effect of EPIT in microglial cells, which appears to be associated with the suppression of the signaling cascades of NF- $\kappa$ B and MAPKs (JNK and

ERK1/2) by affecting the expression of the TLR4 receptor, associated with pro-inflammatory mechanisms.

**Keywords:** Jaborandi, epiisopiloturin, neuroinflammation, microglia, TLR4.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Pilocarpus microphyllus</i> (jaborandi) (A) estrutura química da epiiospiloturina - EPIT (B).....	18
Figura 2 - Processo neuroinflamatório (A) e neurodegenerativo (B).....	23
Figura 3 - Micróglia e seus perfis de polarização M1 e M2.....	25
Figura 4 - Cascata inflamatória desencadeada pelo LPS em células da microgliais da linhagem BV2.....	28
Figura 5 - Fluxograma apresentando o detalhamento do delineamento experimental.....	33
Figura 6 - Estrutura química da epiiospiloturina (EPIT) de <i>Pilocarpus microphyllus</i> .....	35
Figura 7- Representação esquemática do modelo BOILED-EGG.....	36
Figura 8 - Representação esquemática do modelo BOILED-EGG para EPIT.....	41
Figura 9 - Efeito de EPIT sobre a atividade da enzima LDH em células microgliais de linhagem BV2 na ausência (A) e presença (B) de LPS.....	43
Figura 10 - Efeito de EPIT sobre a viabilidade de células microgliais (linhagem BV2) avaliada pelo teste do MTT na ausência (A) e presença (B) de LPS.....	44
Figura 11 - Efeito de EPIT sobre a produção de nitrito em células BV2 expostas ao LPS.....	45
Figura 12 - Estudo do mecanismo de ação anti-inflamatório de EPIT sobre células microgliais expostas ao LPS.....	46
Figura 13 - Efeito de EPIT sobre a expressão da iNOS estimulada pelo LPS em células BV2.....	48
Figura 14 - Efeito de EPIT sobre a produção de IL-1 $\beta$ em células microgliais (linhagem BV2) estimuladas com LPS.....	49
Figura 15 - Efeito de EPIT sobre a produção de IL-6 em células microgliais (linhagem BV2) estimuladas com LPS.....	50
Figura 16 - Efeito de EPIT sobre a produção de TNF- $\alpha$ em células microgliais (linhagem BV2) estimuladas com LPS.....	51
Figura 17 - Efeito de EPIT sobre a produção de IL-10 em células microgliais (linhagem BV2) expostas ao LPS.....	52
Figura 18 - Efeito de EPIT sobre o aumento inicial na expressão do TLR4 em células BV2 tratadas com LPS.....	53
Figura 19 - Efeito de EPIT sobre a expressão proteica do TREM2 em células BV2 submetidas ao modelo de inflamatório pelo LPS.....	54
Figura 20 - Efeito de EPIT sobre a via do NF- $\kappa$ B em células BV2 estimuladas com LPS.....	56
Figura 21 - Efeito de EPIT sobre a fosforilação da proteína JNK em células BV2 submetidas a	

ativação pelo LPS .....	57
Figura 22 - Efeito de EPIT sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 em células BV2 na presença do LPS .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora-1
ARG	Arginase
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina de soro bovino
CCL2	Quimiocina 2 com motivo C-C
CCL5	Quimiocina 5 com motivo C-C
CXCL1	Quimiocina 1 com motivo C-X-C
CXCL10	Quimiocina 10 com motivo C-X-C
CX <sub>3</sub> CR1	Receptor do tipo 1 da quimiocina C-X-C <sub>3</sub>
COX	Ciclo-oxigenase
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EPM	Erro padrão da média
EPIT	Epiisopiloturina
FBS	Soro fetal bovino
FMLP	N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MD-2	Fator de diferenciação mieloide 2
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
MR	Receptor de manose
MTT	Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MYD88	Gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NEED	N-(1-naftil)-etilenodiamina
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
NO	Óxido nítrico

NMDA	N-metil-D-aspartato
p38	Proteína cinase ativada por mitógeno
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SARM	Proteína contendo motivos $\alpha$ e HEAT-tatu estéreis
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
TBS-T	Tris-Tween 20
TIR	Receptor toll interleucina-1
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLR	Receptor <i>toll like</i>
TNB-S	Ácido trinitrobenzenosulfônico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TREM2	Receptor desencadeado expresso nas células mieloides 2
TRIF	Adaptador contendo domínio TIR induzindo IFN- $\beta$
YM	Lectina mamífera

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentagem
°C	Grau centígrado
$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\delta$	delta
K	kappa
$\gamma$	gama
$\mu\text{g}$	Microgramas(s)
$\mu\text{L}$	Microlitro (s)
g	Gramma (s)
M	Molar
mg	Miligramma (s)
mL	Mililitro (s)
kg	Quilogramma (s)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Alcaloides como fonte de novos fármacos: epiisopiloturina de <i>Pilocarpus mycrophyllus</i> (jaborandi).....	17
1.2 Inflamação.....	20
1.3 Neuroinflamação relacionada à neurodegeneração.....	21
1.4 O papel da micróglia na neuroinflamação .....	24
1.5 Células microgliais da linhagem BV2 .....	26
1.6 Micróglia como alvo terapêutico em doenças do SNC .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
4.1 Delineamento experimental .....	33
4.2 Material de estudo .....	34
4.3 Substâncias químicas.....	34
4.4 Avaliação preditiva do potencial de EPIT em permear a barreira hematoencefálica (BHE).....	34
4.4.1 Softwares e plataforma de estudo farmacocinético preditivo .....	34
4.4.2 Método de permeação estimada cerebral e intestinal ( <i>Brain or Intestinal Estimated Permeation Method - BOILED-EGG</i> ).....	35
4.5 Avaliação farmacológica.....	36
4.5.1 Cultura de células microgliais da linhagem BV2.....	36
4.5.2 Avaliação da citotoxicidade de EPIT em células micróglia da Linhagem BV2 .....	36
• Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH).....	36
• Teste do MTT .....	37
4.5.3 Determinação do efeito da EPIT sobre o óxido nítrico (NO) mensurado indiretamente pela produção de nitrito em células BV2 expostas ao LPS.....	38

4.5.4 Avaliação do efeito da EPIT sobre os níveis de interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	38
4.5.5 Efeito de EPIT sobre receptores transmembrana de polarização microglial (TLR4/TREM2) e sobre vias de sinalização intracelulares (iNOS, NF- $\kappa$ B, MAPKs).....	39
Preparo da amostra .....	39
• Preparo do conteúdo proteico total.....	39
4.6 Análise estatística .....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1. Predição estimada da permeação cerebral e intestinal (BOILED-EGG) de EPIT ....	41
5.2 Estudo Farmacológico.....	42
5.2.1 Avaliação da citotoxicidade da EPIT sobre células microgliais da linhagem BV-2 ....	42
• EPIT não interfere na atividade da enzima LDH .....	42
• EPIT não altera o metabolismo de células microgliais através do teste do MTT.....	43
5.2.2 EPIT reduz a produção de óxido nítrico/nitrito em células BV2 expostas ao LPS .....	44
5.2.3 EPIT reduz a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) .....	47
5.2.4 Efeito de EPIT sobre a produção de citocinas em células microgliais da linhagem BV2 ativadas pelo LPS.....	48
• EPIT inibe a produção de IL-1 $\beta$ .....	48
• EPIT reduz a produção de IL-6 .....	49
• EPIT diminui a produção de TNF- $\alpha$ .....	50
• EPIT não altera a concentração de IL-10 em células BV2 expostas ao LPS.....	51
5.2.5 O alcaloide imidazólico EPIT reduz a expressão do receptor TLR4, mas não induz o aumento na expressão do TREM2 em células microgliais (linhagem BV2).....	52
5.2.6 O alcaloide imidazólico EPIT exerce seu efeito anti-inflamatório em células microgliais (linhagem BV2) agindo sobre vias de sinalização intracelulares NF- $\kappa$ B/ MAPKs .....	55
• Ação sobre a via do NF- $\kappa$ B .....	55
• Efeito de EPIT sobre a via das MAPKs: atividade sobre a proteína JNK .....	56
• Efeito de EPIT sobre a via das MAPKs: atuação sobre a fosforilação da proteína ERK1/2	

<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Alcaloides como fonte de novos fármacos: epiisopiloturina de *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi)

Alcaloides são utilizados há pelo menos 3000 anos na forma de chás, poções e medicamentos devido às suas propriedades bioativas (NOUREDDINE BRIBI, 2018). Tais compostos representam cerca de 12000 produtos de origem natural, compreendendo substâncias orgânicas, em grande maioria de caráter básico, que possuem um nitrogênio em sua composição. São derivados principalmente de plantas, mas também podem ser encontradas em fungos, bactérias, insetos e até mesmo em animais. Sua ocorrência natural se dá principalmente em sua forma de base livre, sendo encontrada também na forma de sais ou óxidos (O'CONNOR, 2010; QIU *et al.*, 2014).

O potencial terapêutico dessa classe de metabólitos secundários é reconhecido por sua vasta atividade bioativa e aplicabilidade farmacológica, destacando-se entre seus principais representantes a atropina, a hiosciamina e a escopolamina (anticolinérgicos), a vincristina e a vimblastina (antitumorais), a morfina (hipnoanalgésico) e a pilocarpina (parassimpatomimético). Nesse contexto, a pilocarpina possui contribuição histórica especial devido a seu papel na formulação do conceito de receptor farmacológico (ALVES DE ALMEIDA *et al.*, 2017; FALCÃO *et al.*, 2008; MAEHLE *et al.*, 2002).

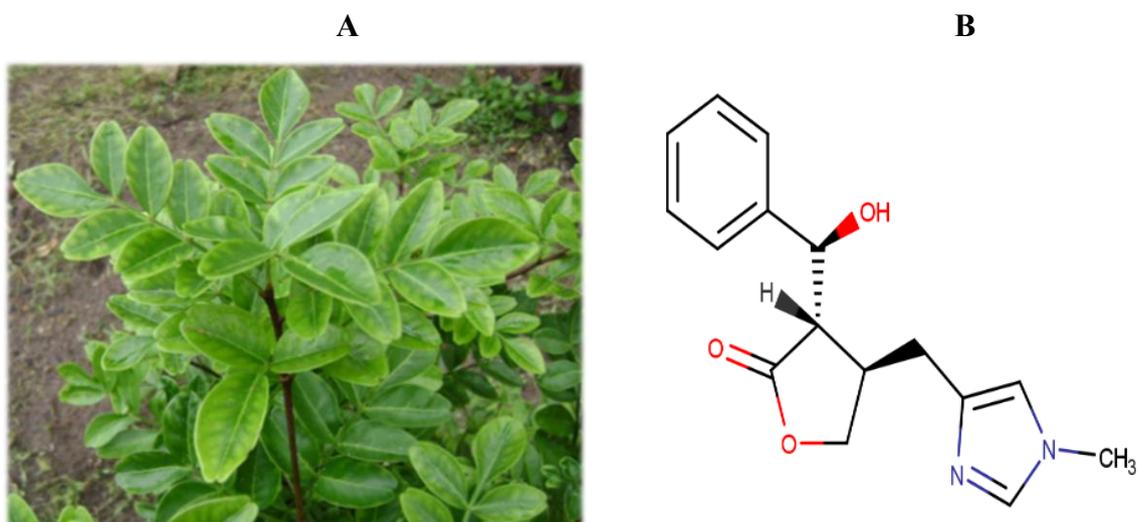
Os alcaloides podem ser classificados quimicamente com base na presença de um anel heterocíclico em sua estrutura, podendo ser denominados em alcaloides com anel tropano, alcaloides pirrolizidínicos, piperidínicos, quinolínicos, isoquinolínicos, indólicos, alcaloides com núcleo pirrolidina, alcaloides esteroidais, alcaloides púricos e alcaloides imidazólicos (DEY *et al.*, 2020). Essa última classe, os alcaloides imidazólicos possuem dentre seus representantes a pilocarpina, substância isolada de *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi), espécie pertencente à família Rutaceae, grupo especial de espécies vegetais constituída por aproximadamente 161 gêneros e 193 espécies, que têm contribuído significativamente para a descoberta de novos alcaloides bioativos (PIRANI, J.R. & GROppo, 2012).

*Pilocarpus microphyllus*, conhecida popularmente como jaborandi, é uma planta nativa e cultivada no Brasil, presente principalmente nas regiões Norte e Nordeste, possui folhas ricas em alcaloides, como a pilocarpina, isolada primeiramente em 1875 e empregada há décadas no tratamento do glaucoma, e mais recentemente usada no tratamento da xerostomia (HENDRICKSON; MOROCCO; MICHAEL I. GREENBERG, 2004; SANTOS; ROBERTO; MORENO, 2004; THEUNISSEN *et al.*, 2021). Além da pilocarpina, outros alcaloides também

são isolados a partir das folhas de *P. microphyllus*, como a isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, dictamina, macaubina (HENDRICKSON; MOROCCO; MICHAEL I. GREENBERG, 2004; SANTOS; ROBERTO; MORENO, 2004), e alguns destes se destacam com potenciais atividades farmacológicas, como os alcaloides imidazólicos epiisopilosina (propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e anti-helmíntica) (GUIMARÃES *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2019) e a epiisopiloturina (propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e anti-helmíntica). Recentemente, a epiisopiloturina vem recebendo bastante notoriedade, devido a existência crescente de relatos na literatura, que evidenciam seu potencial terapêutico, tornando-a uma molécula promissora para o emprego na medicina humana (ANDRADE-NETO *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 2019; SANTOS; ROBERTO; MORENO, 2004; VERAS *et al.*, 2012).

A epiisopiloturina (EPIT), alcaloide imidazólico de *P. microphyllus*, e material de estudo do presente trabalho (**figura 1 A e B**), é isolada a partir de resíduo industrial da extração de pilocarpina (VERAS *et al.*, 2012). Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa do Brasil têm estudado o potencial farmacológico da EPIT, incluindo o nosso grupo, que têm investido em estudos com essa molécula na área da inflamação e dor em parceria com a Phytobios Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação LTDA – Grupo Centroflora (Barueri, SP) (BENTO *et al.*, 2010; NICOLAU *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2019; RODRIGUES DE CARVALHO *et al.*, 2018; VERAS *et al.*, 2012).

**Figura 1** - *Pilocarpus mycrophyllus* (jaborandi) (A) estrutura química da epiisopiloturina - EPIT (B)



Fonte: A) Miura, (2009), adaptado. B) Imagem criada pelo autor no software Marvin Sketch (ChemAxon, USA)

Estudos já demonstraram a atividade antinociceptiva dessa molécula (1mg/kg, via intraperitoneal) através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, pelo teste da placa quente e teste da formalina. Esse último modelo, demonstrou ainda que a ação antinociceptiva desse alcaloide estaria em parte relacionada a sua ação em receptores opioides visto que a administração de naloxona (antagonista opioide) reverteu sua atividade antinociceptiva (SILVA *et al.*, 2013). EPIT (0,1 - 1 mg/kg, via intraperitoneal) também demonstrou atividade anti-inflamatória em modelos de edema de pata induzido por carragenina, histamina, serotonina, bradicinina, dextrana sulfatada em camundongos, além da ação anti-inflamatória (1, 10 e 30 mg/kg, via intraperitoneal e oral) em modelo de gastrite induzida por naproxeno em ratos (NICOLAU *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2013).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito anti-inflamatório dessa substância em neutrófilos humanos, através de sua ação em modular os mecanismos de degranulação dessas células, inibindo a liberação da enzima mieloperoxidase (MPO), a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o influxo de cálcio induzido por estímulos distintos (acetato miristato de forbol - PMA e N-formilmetionil-leucil-fenilalanina - fMLP). Demonstramos também o efeito antinociceptivo desse alcaloide (0,3 – 1 mg/kg, via intraperitoneal) em modelos de dor inflamatória aguda induzida por carragenina em roedores (ROCHA *et al.*, 2019, ROCHA., 2017). Recentemente (ROCHA, 2021), comprovamos o efeito antinociceptivo da EPIT e da formulação farmacêutica líquida, empregando a EPIT como insumo farmacêutico ativo, nos modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina (agudo) ou de hipernocicepção inflamatória persistente induzida pelo adjuvante completo de Freund em camundongos. O efeito antinociceptivo da EPIT (1 – 10 mg/kg, via oral) em camundongos demonstrado nesse estudo, parece estar relacionado a sua habilidade de bloquear o curso da sensibilização e ativação de nociceptores pela ativação da via NO/GMPc/PKG/K<sup>+</sup>ATP e de forma indireta prevenindo a sensibilização dos nociceptores pela modulação da resposta imune/inflamatória (ROCHA, 2021).

Percebendo o potencial anti-inflamatório da EPIT, através de sua capacidade em modular o componente imune celular nas metodologias *in vitro* e *in vivo* nos modelos estudados, e considerando o alto impacto social no Brasil e no mundo que as doenças de origem inflamatória causam, é urgente prosseguirmos no desenvolvimento do fitofármaco epiisopiloturina (EPIT) com o objetivo de elucidar novas propriedades farmacológicas dessa molécula em outras células do sistema imune inato, agregando assim, evidências para o seu uso futuro como medicamento em doenças que possuem a inflamação como componente causal.

## 1.2 Inflamação

A inflamação consiste em uma resposta do sistema imune, geralmente desencadeada por microrganismos invasores por meio da sinalização gerada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), através também de sinais endógenos via padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou ainda compostos tóxicos (CHEN *et al.*, 2018). Classicamente, o processo inflamatório agudo busca a remoção do estímulo nocivo. Nesse cenário, diversos eventos e interações celulares e moleculares, minimizam com sucesso infecções e lesões eminentes, contribuindo dessa forma para a restauração da homeostase. Em contrapartida, em situações incontroláveis, o processo inflamatório se instala, levando a formação de um ambiente inflamatório crônico (ZHOU; HONG; HUANG, 2016).

Em nível tecidual, a inflamação é caracterizada por eritema, edema, rubor, dor e perda de função, processos resultantes da resposta celular local desempenhada no contexto vascular e inflamatório. Importantes acontecimentos microcirculatórios também ocorrem durante esse evento, incluído mudanças na permeabilidade vascular, recrutamento e acúmulo de leucócitos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). No contexto molecular, citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e quimiocinas como a IL-8 e a CXCL10, são produzidas por células da imunidade inata/adaptativa em resposta ao estímulo nocivo, e dessa forma induzem cascatas moleculares que orquestram o processo inflamatório (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004; MOSER; WILLIMANN, 2004; NETEA *et al.*, 2017).

Nessa perspectiva, os macrófagos são células que constituem um componente essencial da imunidade inata e, conseqüentemente, têm um papel importante na resposta inflamatória (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014). Diversos estudos destacam também funções em processos metabólicos (SAEKI; IMAI, 2020), envolvimento na remoção de restos celulares (HERZOG *et al.*, 2019), reparo e remodelamento de tecidos (BOSURGI *et al.*, 2017), colocando tais agentes imunes com importantes atribuições em processos fisiológicos e patológicos (ZHANG; YANG; ERICSSON, 2021).

Ao nível de localização corpórea, essas células possuem ampla distribuição em tecidos linfoides e não linfoides, sendo a micróglia, conhecida imunologicamente como o macrófago do sistema nervoso central (SNC). Nessa condição, esse tipo celular, integrante das células da glia, acaba sendo responsável por regular e desempenhar diversos mecanismos homeostáticos e de defesa nesse sistema (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

### 1.3 Neuroinflamação relacionada à neurodegeneração

A neuroinflamação é a forma restrita do processo inflamatório ao sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), consistindo em eventos de aumento da permeabilidade vascular, infiltrado leucocitário e produção aumentada de mediadores inflamatórios nesses sítios (MATSUDA; HUH; JI, 2019). Em particular, no que diz respeito a migração de células imunes periféricas para os tecidos atingidos, parece existirem diferenças na perspectiva temporal, onde inicialmente, neutrófilos (horas), subsequentemente macrófagos (dias) e tardiamente linfócitos T (dias a semanas) adentrariam ao sistema nervoso central e periférico e contribuiriam para a progressão da neuroinflamação (COSTIGAN *et al.*, 2009; OLD *et al.*, 2014). Somado a tais mecanismos, as células endoteliais vasculares cerebrais também acrescentam uma contribuição intensa na propagação desses sinais inflamatórios no parênquima cerebral (DUNN *et al.*, 2006).

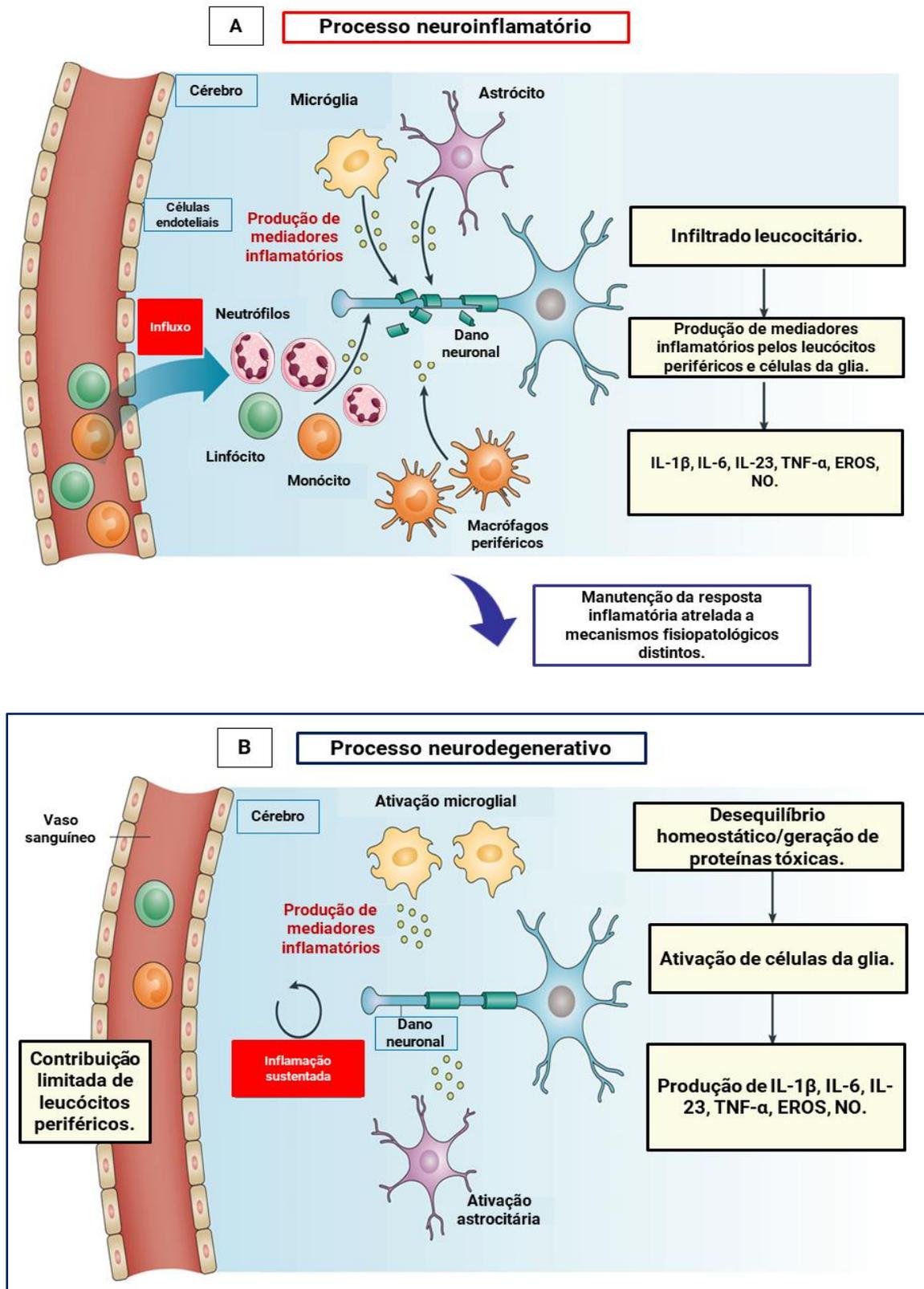
No panorama do desenvolvimento desse fenômeno em resposta à ativação das células da glia periféricas, como as células de Schwann (nos nervos) e as células satélites (gânglios), e células gliais centrais como a micróglia, os astrócitos e os oligodendrócitos no cérebro e na medula espinhal, a neuroinflamação está altamente envolvida com diversas doenças do SNC de caráter inflamatório, como a esclerose múltipla, a encefalite infecciosa e a dor neuropática, e em patologias onde a etiologia primária não é inflamatória, mas sim neurodegenerativa (GILHUS; DEUSCHL, 2019), como a doença de Parkinson, a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Alzheimer, devido à produção de mediadores gliais pró-inflamatórios como citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (CCL2, CCL5 e CXCL1), espécies reativas de oxigênio (EROs) e segundos mensageiros (óxido nítrico – NO e prostaglandinas) (**figura 2A**) (DAMON DISABATO; NING QUAN; JONATHAN P. GODBOUT, 2016; JI; BERTA; NEDERGAARD, 2013; JI; XU; GAO, 2014).

A resposta neuroinflamatória possui consequências do ponto de vista fisiológico, bioquímico, psicológico e imune, e toda a progressão desse estado e os possíveis danos associados, dependem do contexto, duração e natureza do estímulo primário (DAMON DISABATO; NING QUAN; JONATHAN P. GODBOUT, 2016). Em todas as discussões envolvendo tais aspectos de contextualização da neuroinflamação, a ocorrência de vias neurodegenerativas é um processo intimamente relacionado, sendo assim, a resposta inflamatória exacerbada existente, acaba possuindo uma função central na gênese de doenças que acometem o SNC (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017).

A neurodegeneração é um fenômeno intrínseco ao sistema nervoso central e ao contrário de eventos classicamente neuroinflamatórios, onde as células leucocitárias periféricas

possuem uma contribuição somada à resposta oriunda de células da glia, no microambiente inflamatório que permeia as vias de neurodegeneração a resposta inflamatória é predominante desempenhada por células residentes (células de Schwann e células satélites, astrócitos, oligodendrócitos e a micróglia) incluindo a produção de mediadores (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, TNF- $\alpha$ , EROs, NO) e geração de proteínas tóxicas ( $\alpha$ -sinucleína e placas de proteínas  $\beta$ -amiloides) (CHEN; ZHANG; HUANG, 2016; GUZMAN-MARTINEZ *et al.*, 2019; HEPPNER; RANSOHOFF; BECHER, 2015). Em diversas circunstâncias relacionadas a esse quadro, a micróglia constitui ponto central no desequilíbrio homeostático gerado e na gênese e manutenção da inflamação (**figura 2B**) (RANSOHOFF; EL KHOURY, 2016).

Figura 2 - Processo neuroinflamatório (A) e neurodegenerativo (B)



Fonte: Becher e colaboradores (2017), adaptado. Legenda: Espécies reativas de oxigênio (EROS), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); interleucina (IL); óxido nítrico (NO).

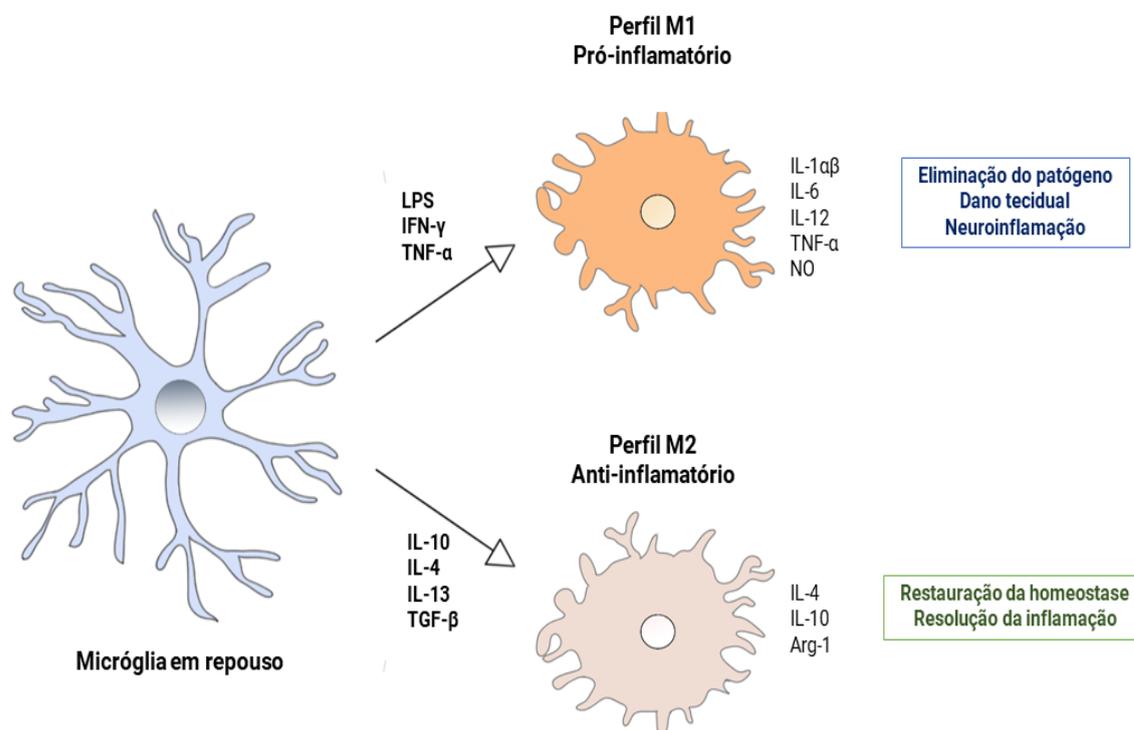
#### 1.4 O papel da micróglia na neuroinflamação

A micróglia constitui cerca de 5-12% das células do SNC (LAWSON *et al.*, 1990). São derivadas da linhagem mieloide e responsáveis pela defesa contra patógenos e estados de desordem no parênquima cerebral (RANSOHOFF; EL KHOURY, 2016). Esse tipo celular, foi descrito pela primeira vez em 1913 por Santiago Ramón e colaboradores e oficialmente nomeada e fenotipicamente caracterizada em 1919, por Pío Del Río Hortega e colaboradores (PÉREZ-CERDÁ; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2015). São classicamente conhecidas como macrófagos do SNC, devido à origem em comum com macrófagos originados do sangue periférico e com as células de Kupffer (macrófagos residentes no fígado), a partir de progenitores eritro-mieloides encontrados no saco vitelínico (GINHOUX *et al.*, 2013). Em camundongos, tais progenitores migram para o cérebro aproximadamente no nono dia do período embrionário, antes de se diferenciarem em células micróglia maduras (CUNNINGHAM; MARTÍNEZ-CERDEÑO; NOCTOR, 2013; UENO *et al.*, 2013). Em humanos, esse processo de migração, começa por volta da quarta semana gestacional (LI; BARRES, 2018; MONIER *et al.*, 2007).

Por serem células sentinelas, a micróglia está sempre “patrulhando o SNC”, por meio de suas ramificações presentes na ausência de um estímulo deletério (conformação de repouso) (**figura 3**). Quando ativadas por sinais exógenos como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou endógenos (DNA, RNA, proteínas) assumem um formato ameboide e passam a desempenhar atividades fagocíticas, agem como células apresentadoras de antígenos e secretam diversos mediadores pró-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a IL-6 no local de ação. Esse perfil de polarização celular conhecido como M1, está associado ao extenso dano tecidual e com os estados de neuroinflamação e neurodegeneração (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; RODRÍGUEZ-GÓMEZ *et al.*, 2020; YAMASAKI *et al.*, 2014).

Com a eliminação do estímulo nocivo ou visando restabelecer a homeostase, um caráter alternativo de polarização microglial surge, adquirindo um fenótipo propenso à imunorregulação e formação de um ambiente anti-inflamatório, com aspectos de neuroproteção. Esse perfil microglial conhecido como M2 trabalha de forma coordenada a induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e fator de crescimento transformador beta – TGF- $\beta$ ) assim como para aumentar a expressão de *RNAs* mensageiros (*Arginase - Arg1; Ym1/2* – lectina da matriz extracelular; receptor de manose – *Mr1*) relacionados à modulação negativa de mediadores pró-inflamatórios (CHANG *et al.*, 2001; INES MARIA CORRALIZA, GERMAN SOLER, 1995; ORIHUELA; MCPHERSON; HARRY, 2016).

**Figura 3** - Micróglia e seus perfis de polarização M1 e M2



Fonte: autoria própria. Legenda: Arginase (arg1); fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ); fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); interleucina (IL); interferon do tipo gama (INF- $\gamma$ ); óxido nítrico (NO).

Uma via de sinalização microglial que vem sendo amplamente estudada, como forma de elucidar os mecanismos envolvidos em doenças que acometem o sistema nervoso central envolve mediadores inflamatórios, de forma especial, o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a IL-6 (TSUDA *et al.*, 2003). Moléculas transmembranas presentes na micróglia, como a família dos receptores do tipo *Toll like* (TLRs), que parecem estar envolvidas em uma série de patologias (doença de Parkinson, esclerose múltipla, a doença de Alzheimer) acabam por gerar tais mediadores como produto final de sua cascata inflamatória (GORECKI; ANYAEGBU; ANDERTON, 2021; LEITNER *et al.*, 2019; NIRANJAN, 2013; ZHOU *et al.*, 2020). Em particular, a ativação do *Toll like* do tipo 4 (TLR4) atua induzindo a sinalização de diversas vias intracelulares, dentre elas a do fator nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B - agente regulador de diversos genes pró-inflamatórios), via sua translocação para o núcleo da célula. Evidências têm demonstrado (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007; KAWAI; AKIRA, 2011; SHIH; WANG; YANG, 2015; YAKOVLEVA *et al.*, 2011), que a participação dessa via de sinalização é responsável pela produção de uma gama de mediadores pró-inflamatórios, que acabam por promover vias que contribuem no desenvolvimento da morte neuronal, além da capacidade de promover mudanças na permeabilidade da barreira hematoencefálica, gerando assim, um estado de inflamação vascular

cerebral, devido a produção de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE2) (STONE; KASTIN; PAN, 2011).

Além do NF- $\kappa$ B, outras vias intracelulares de sinalização são induzidas pela cascata de ativação do TLR4 em células microgliais e acabam contribuindo para a instalação do estado neuroinflamatório, a exemplo das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que incluem a JNK, ERK1/2 e a p-38, e que ao serem fosforiladas pela ativação do TLR4 induzem fatores de transcrição presentes no citoplasma (NF- $\kappa$ B) e no núcleo, a exemplo da proteína ativadora 1 (AP-1) (FENG *et al.*, 2014; GOLDMANN *et al.*, 2013). O fator de transcrição AP-1 é um dímero, membro das proteínas zíper básicas de leucina, principalmente das famílias *Fos* e *Jun*, que delega em parte, a produção de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e a IL-6) após a ativação da via das MAPKs (HANNEMANN *et al.*, 2017; LIAUNARDY-JOPEACE; GAY, 2014; NDLOVU *et al.*, 2009; WHITMARSH; DAVIS, 1996).

Em contrapartida, outras moléculas transmembranas como o receptor desencadeado expresso nas células mieloides 2 (TREM2) parecem estar relacionadas a indução de um estado neuroreparador. O TREM2 foi inicialmente descrito em monócitos, mas também está presente na micróglia. Esse receptor possui ligantes iônicos (fosfolipídios e sulfamidas), o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e o DNA (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000). Estudos destacam que esse receptor regula a fisiologia da micróglia, sendo capaz de induzir o estado anti-inflamatório em algumas condições patológicas como a doença de Alzheimer (WALTER, 2016; XUE; DU, 2021) através de uma ativação conjunta com seu co-receptor DAP12. Sendo assim, ligantes diretos ou substâncias que através de um efeito indireto consigam aumentar a sua expressão, podem ter efeitos benéficos no panorama da neuroinflamação.

### 1.5 Células microgliais da linhagem BV2

Com a eminente importância da micróglia na neuroinflamação associada à neurodegeneração e conseqüentemente doenças do sistema nervoso central, diversos modelos de características pró-inflamatórias realizados em um ambiente *in vitro* estão sendo desenvolvidos no decorrer do tempo por meio da utilização de cultura primária murina ou linhagens de células imortalizadas, tais como as linhagens N9, N13, BV2, CHME e HMO6, com o objetivo de permitir um melhor estudo do papel biológico desse tipo celular em condições que mimetizam parcialmente um estado patológico (JANABI *et al.*, 1995; TIMMERMAN; BURM; BAJRAMOVIC, 2018).

As células BV2 constituem uma linhagem microglial oriunda de camundongos,

altamente difundida e utilizada em todo o mundo no campo de estudo da neuroinflamação, devido serem bem caracterizadas do ponto de vista genotípico, extensivamente empregadas nos modelos experimentais que avaliam o papel biológico desse tipo celular, surgindo como uma substituta válida em diversas ocasiões para a cultura primária murina (difícil obtenção, aspectos éticos) e outras linhagens celulares imortalizadas oriundas de ratos (N9, N13) e da espécie humana (CHME e HMO6, difícil obtenção) por apresentarem técnicas de cultivo já estabelecidas e de forma mais recente, por demonstrarem aplicação em estudos que avaliam interação com outras células da glia (co-cultura) (GIULIAN, 1999; HENN *et al.*, 2009; JOSEPH; JOSÉ LUIS VENERO, 2013; POLLOCK *et al.*, 2020).

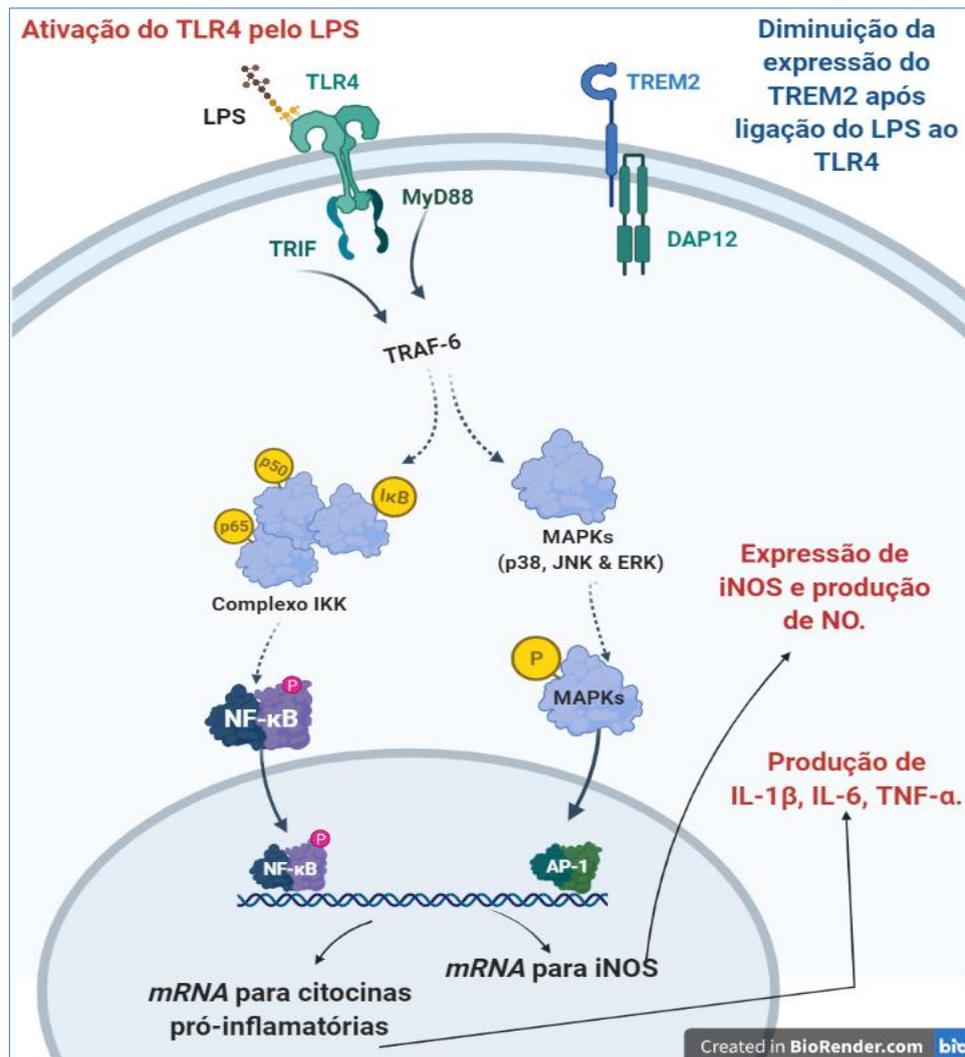
A linhagem BV2 responde amplamente a estímulos de ativação como o lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram negativas, induzindo sua maquinaria celular a produzir mediadores pró-inflamatórios que incluem a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , quimiocinas, a expressão de enzimas como a COX-2 e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO) (DE SMEDT-PEYRUSSE *et al.*, 2008; POPIOLEK-BARCZYK *et al.*, 2015; ROJEWSKA *et al.*, 2014).

O mecanismo pelo qual o LPS induz processo inflamatório nas células BV2, ocorre através de sua ligação ao receptor TLR4 (CHEN *et al.*, 2012) (**figura 4**). Esse processo de ativação envolve o contato dessa endotoxina bacteriana com o complexo TLR4/MD-2, após essa interação, o TLR4 sofre oligomerização e recruta seus adaptadores via comunicação com o domínio TIR (receptor toll interleucina-1) (LU; YEH; OHASHI, 2008). Existem 5 proteínas adaptadoras contendo o domínio TIR, sendo elas a *MyD88* (gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR, também conhecida como *Mal*, tipo adaptador MyD88), TRIF (adaptador contendo domínio TIR induzindo IFN- $\beta$ ), TRAM (molécula adaptadora relacionada a TRIF) e a SARM (proteína contendo motivos  $\alpha$  e HEAT-tatu estéreis). Durante a ativação microglial induzida pelo LPS, o TLR4 aciona todas as proteínas adaptadoras em questão, e induz as cascatas inflamatórias intracelulares (via das MAPKs e do NF- $\kappa$ B) (LU; YEH; OHASHI, 2008; O'NEILL; BOWIE, 2007).

Como visto, evidências acumuladas corroboram o papel-chave de uma ativação aberrante desse receptor, no importante processo inflamatório observado no desenvolvimento de doenças do sistema nervoso central. Portanto, o uso do LPS para mimetizar esse ambiente pró-inflamatório advindo da ativação do TLR4, é uma importante ferramenta para a pesquisa de substâncias com potencial aplicabilidade terapêutica, visto a recente (DAI *et al.*, 2020; JIN

*el al.*, 2018; *LI el al.*, 2020; *OH el al.*, 2013) introdução da micróglia, como alvo farmacológico que pode contribuir para o tratamento de doenças que afetam o SNC, principalmente através da diminuição de vias de sinalização que resultem na liberação de mediadores pró-inflamatórios e na indução de um perfil celular M2, de caráter neuroprotetor.

**Figura 4** - Cascata inflamatória desencadeada pelo LPS em células da microgliais da linhagem BV2



Fonte: autoria própria, figura feita na plataforma digital Biorender. Legenda: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); interleucina (IL); óxido nítrico (NO); proteína ativadora de DNAX (DAP12); proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs); receptor desencadeado expresso nas células mieloides 2 (TREM2); receptor do tipo Toll like (TLR4).

## 1.6 Micróglia como alvo terapêutico em doenças do SNC

A ativação microglial crônica está envolvida com a fisiopatologia de diversas doenças do sistema nervoso central (FATOBA; ITOKAZU; YAMASHITA, 2020). Estudos destacam que essa célula pode iniciar o processo de disfunção neural e consequente neurodegeneração através da perda do seu perfil homeostático e ganho de funções aberrantes (PRILLER *et al.*, 2001; PRILLER; PRINZ, 2019).

Trabalhos recentes evidenciaram que na doença de Parkinson, a agregação de proteínas ( $\alpha$ -sinucleína) não seria a única causa na indução da morte neuronal, aparentemente a ativação do sistema imune através da micróglia, via mediadores pró-inflamatórios liberados durante a morte desses neurônios, também contribuiria para a progressão dessa enfermidade (BACHILLER *et al.*, 2018; PERRY, 2012). Na doença de Alzheimer as placas amiloides (depósitos de proteínas  $\beta$ -amiloides) conseguem ativar a resposta inflamatória da micróglia, levando a geração de mediadores inflamatórios (BACHILLER *et al.*, 2018; VENEGAS; HENEKA, 2017). No panorama da dor neuropática, após uma lesão nervosa, agentes liberados pelos neurônios danificados, contribuem para a ativação microglial (perfil M1), causando mudanças em sua morfologia, migração para o local afetado (quando este se encontra no SNC), e aumento de sua proliferação na raiz dorsal (após uma lesão em nervos periféricos) (INOUE; TSUDA, 2018). Além dessas condições clínicas, a micróglia parece desempenhar ainda, papéis importantes na esclerose múltipla, esquizofrenia, depressão dentre outras doenças que acometem o sistema nervoso central (BRITES; FERNANDES, 2015; GUERRERO; SICOTTE, 2020; PRILLER; PRINZ, 2019).

A modulação da resposta inflamatória microglial em modelos *in vivo* é uma tarefa difícil, visto que essas células não podem ser facilmente acessadas, devido proteção exercida pela BHE que através de junções entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos, regula a passagem de moléculas para o parênquima cerebral (PRILLER *et al.*, 2001). Nesse sentido, os modelos de predição de propriedade farmacocinéticas são cada vez mais utilizados durante a pesquisa e triagem de novos compostos farmacológicos para doenças que afetam o SNC, com o intuito de evidenciar propriedades adequadas de absorção e distribuição, metabolismo e excreção, que possibilitem a permeabilidade da BHE, haja visto que 60% das falhas no processo de desenvolvimento de medicamentos, são ocasionadas por propriedades farmacocinéticas inadequadas (HANN; SIMPSON, 2014). Sendo assim, softwares e plataformas de predição farmacocinética online, podem se tornar grandes aliadas na busca por novas substâncias bioativas que possam vir a serem usadas na medicina humana (DAINA; ZOETE, 2016).

Com o exposto, é cada vez mais evidente que a diminuição da resposta inflamatória

mediada pela micróglia representa uma estratégia importante para a terapia de doenças que possuem a neuroinflamação em seu componente fisiopatológico (KWON; KOH, 2020). Dessa forma, considerando o potencial biológico dos alcaloides (FOSS *et al.*, 2020; KUAI *et al.*, 2020; QUINTANS *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2020), em especial o alcaloide imidazólico episopiloturina do jaborandi, que tem mostrado potencial anti-inflamatório promissor (ROCHA, 2017; ROCHA, 2021; ROCHA *et al.*, 2019) é oportuno investir em pesquisas avaliando seu possível efeito anti-neuroinflamatório, que poderá auxiliar sobremaneira no tratamento de doenças neurodegenerativas, cuja a farmacoterapia atual possui limitações importantes.

## 2 JUSTIFICATIVA

*Pilocarpus mycrophyllus* (jaborandi) é uma planta nativa do Brasil, possui folhas ricas em alcaloides, servindo como fonte de matéria-prima industrial para extração da pilocarpina, alcaloide imidazólico utilizado no tratamento do glaucoma. Além da pilocarpina, existem outros alcaloides imidazólicos presentes nas folhas dessa espécie com potencial farmacológico, a exemplo da epiisopiloturina (EPIT).

O processo inflamatório tem importância fundamental na gênese de várias patologias, como a asma, câncer, diabetes, doenças autoimunes e neurodegenerativas. A neuroinflamação, complexa resposta que envolve a ativação de células da glia e produção de mediadores inflamatórios, está diretamente envolvida com a fisiopatologia de diversas enfermidades que acometem o sistema nervoso central, tais como a doença de Parkinson, a dor neuropática e a doença de Alzheimer. Nesse cenário, a micróglia, célula imune inata do parênquima cerebral, possui papel de destaque por orquestrar a resposta inflamatória em situações que afetam o estado homeostático. Dessa forma, a micróglia constitui um alvo celular de interesse no desenvolvimento de novos fármacos capazes de modular sua ativação e consequente secreção de mediadores inflamatórios, tornando-se assim uma opção terapêutica promissora para o tratamento de distúrbios no SNC.

Nesse contexto, percebe-se a importância do investimento em pesquisas que visem a geração de novos medicamentos com aproveitamento da biodiversidade química da flora nativa do Nordeste, como a exemplo do alcaloide imidazólico bioativo Epiisopiloturina (EPIT) de *P. mycrophyllus*, que já demonstrou atividade anti-inflamatória em células do sistema imune inato periférico (neutrófilos humano) e atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor inflamatória determinados pelo nosso grupo de pesquisa e outros estudos e que pode vir a ser útil em reduzir a ativação microglial presente como um dos componentes que permeiam a neuroinflamação. Desta forma, considerando o papel importante da neuroinflamação na instalação e agravamento de doenças neurodegenerativas, é estratégico prosseguirmos investigando o alcaloide EPIT visando comprovar seu efeito anti-inflamatório em células microgliais.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o efeito do alcaloide imidazólico epiisopiloturina (EPIT) sobre a resposta inflamatória de células microgлияis de linhagem BV2 e elucidar o possível mecanismo de sua ação avaliando as vias de sinalização pró e anti-inflamatórias.

#### **3.2 Objetivos específicos**

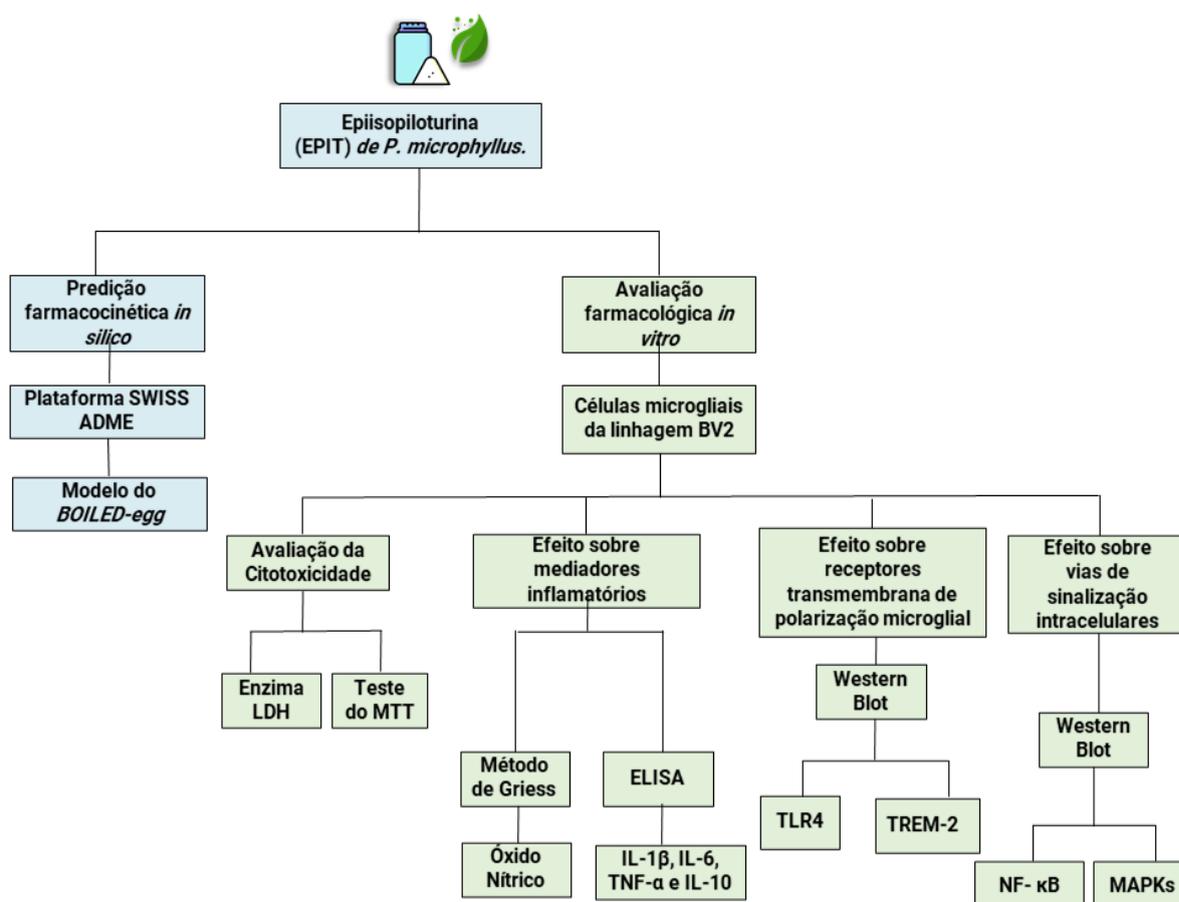
- Avaliar a capacidade de EPIT em penetrar a barreira hematoencefálica (BHE), por meio de plataformas online de predição farmacocinética;
- Investigar a citotoxicidade de EPIT sobre células microgлияis da linhagem BV2;
- Avaliar o efeito da EPIT sobre a produção de nitrito induzida por LPS em células BV2;
- Estudar o efeito da EPIT sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$  e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) em células microgлияis da linhagem BV2 expostas ao LPS;
- Avaliar o efeito de EPIT sobre a expressão dos receptores transmembranas de polarização microgлияl (TLR4/ TREM2) e sobre vias de sinalização intracelulares (iNOS; NF- $\kappa$ B; MAPKs) por Western blot.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento experimental

O presente estudo possui abordagem experimental na qual foi explorada o potencial farmacológico (ROCHA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2013) do alcaloide imidazólico epiisopiloturina (EPIT) isolado da espécie *P. microphyllus* (jaborandi), trabalho que agregou método *in silico* de predição de características farmacocinéticas, bem como modelo *in vitro* de inflamação central (células microgliais da linhagem BV2) visando demonstrar de forma inédita o efeito anti-inflamatório dessa molécula em células imunes do parênquima cerebral. A **figura 5**, apresenta por meio de um fluxograma as etapas metodológicas empregadas no delineamento experimental.

**Figura 5** - Fluxograma apresentando o detalhamento do delineamento experimental



Fonte: autoria própria. Legenda: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); interleucina (IL); Lactado desidrogenase (LDH); óxido nítrico (NO); proteína ativadora de DNAX (DAP12); proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs); receptor desencadeado expresso nas células mieloides 2 (TREM2); receptor do tipo Toll like (TLR4).

## 4.2 Material de estudo

O alcaloide imidazólico episopiloturina (EPIT, 99,7% de pureza) foi obtido a partir de um subproduto (resíduo industrial) proveniente do processo de isolamento da pilocarpina a partir das folhas de *P. mycrophyllus* (Exsicata HDELTA2869), um produto comercial da empresa Phytobios (Barueri, São Paulo), empresa do grupo Centroflora. O projeto encontrasse registrado no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado - SisGen (<https://sisgen.gov.br/paginas/login.aspx>) sob código de cadastro A2914F3.

## 4.3 Substâncias químicas

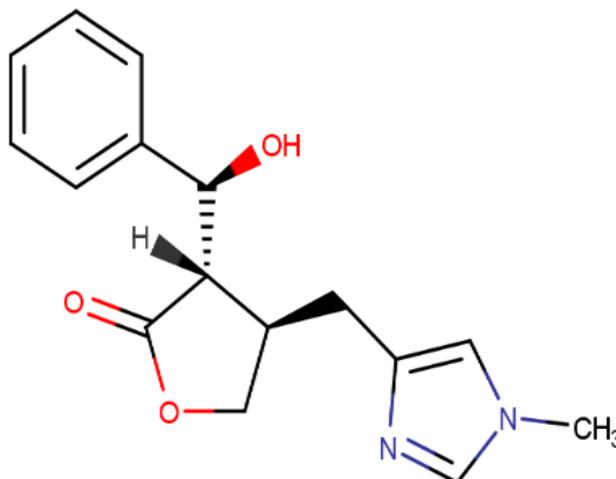
N-(1-naftil)-etilenodiamina (NEED) (Sigma-Aldrich, EUA), albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, EUA), álcool etílico absoluto P.A (Dinâmica, Brasil), brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, EUA), cloreto de sódio P.A (Dinâmica, Brasil), cloreto de potássio P.A (Dinâmica, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EUA), dodecil sulfato de sódio (SDS) (Biorad, EUA), desoxicolato de sódio (Biorad, EUA), fosfato de sódio monobásico P.A (Dinâmica, Brasil), fosfato de sódio dibásico P.A (Dinâmica, Brasil), glicerol (Dinâmica, Brasil), lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma-Aldrich, EUA), metanol (Dinâmica, Brasil), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco by Life Technologies, EUA), soro fetal bovino (FBS) (Gibco by Life Technologies, EUA), sulfanilamida (Dinâmica, Brasil), tris-HCl (Dinâmica, Brasil), Triton x-100 (Sigma-Aldrich, EUA).

## 4.4 Avaliação preditiva do potencial de EPIT em permear a barreira hematoencefálica (BHE)

### 4.4.1 Softwares e plataforma de estudo farmacocinético preditivo

A estrutura química da EPIT foi desenhada através do *software* Marvin Sketch (*ChemAxon, USA*) (**figura 6**) e em seguida convertida em documento do tipo SMILE, o qual foi devidamente submetido à análise no servidor de domínio *online* Swiss ADME (<http://swissadme.ch/>), plataforma científica gratuita que prediz, respectivamente, propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e regras de *druglikeness* de moléculas com potencial aplicabilidade para a saúde.

**Figura 6** - Estrutura química da epiisopiloturina (EPIT) de *Pilocarpus microphyllus*



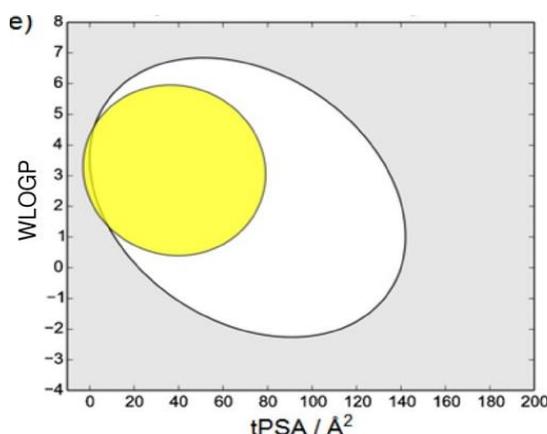
Legenda: imagem criada pelo autor no *software* Marvin Sketch (ChemAxon, USA).

#### 4.4.2 Método de permeação estimada cerebral e intestinal (*Brain or Intestinal Estimated Permeation Method - BOILED-EGG*)

A estrutura química de EPIT foi submetida ao método *BOILED-EGG* situado na plataforma Swiss ADME. Tal ferramenta calcula a lipofilicidade e a polaridade de pequenas moléculas, gerando visualmente duas regiões sobrepostas, semelhantes a um “ovo cozido” o que condiz com a tradução livre em português.

De forma suscita, moléculas presentes na região branca (clara do ovo) terão maior probabilidade de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal (**figura 7**). De maneira complementar moléculas presentes na região amarela (gema do ovo) também poderão ser absorvidas pelo trato gastrointestinal, porém terão uma maior probabilidade de permear a barreira hematoencefálica (BHE), dado obtido através da correlação da lipofilicidade (WLOGP) das estruturas químicas analisadas com a sua área de superfície polar (TPSA) (DAINA; ZOETE, 2016).

**Figura 7-** Representação esquemática do modelo BOILED-EGG



Fonte: Daina & Zoete (2016), adaptado.

## 4.5 Avaliação farmacológica

### 4.5.1 Cultura de células microgliais da linhagem BV2

A linhagem de células BV2 utilizada nos experimentos foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As condições de cultivo consistiram na utilização de meio de cultura RPMI-1640 (*Gibco by Life Technologies, USA*), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), a uma temperatura de 37°C, sob atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.5.2 Avaliação da citotoxicidade de EPIT em células microgliais da Linhagem BV2

- **Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)**

O início da investigação da citotoxicidade preliminar do alcaloide imidazólico EPIT em células do SNC foi realizada através do ensaio de determinação da atividade da LDH. Tal enzima encontra-se constitutivamente presente no citoplasma e o aumento de sua atividade no ambiente extracelular é utilizado como marcador de dano na membrana plasmática, processo característico de células que estão sofrendo apoptose, necrose e outras formas de morte celular como a piroptose e a ferroptose (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Para tanto, células microgliais (linhagem BV2) a uma população de  $1 \times 10^5$  células/mL foram adicionadas a uma placa de 96 poços. Decorrida 1 hora do plaqueamento, a suspensão de células foi incubada com EPIT diluída em dimetilsulfóxido (DMSO - concentração final: 0,1%) em concentrações crescentes (3,5; 35; 87,5; 175 e 350  $\mu$ M) escolhidas em detrimento a estudos anteriores realizadas pelo nosso grupo de pesquisa (ROCHA *et al.*, 2019). As demais células da linhagem BV2 também foram incubadas com o grupo veículo/RPMI (a FBS 1% e DMSO 0,1%) e com o grupo Triton x-100 (0, 01% - padrão citotóxico). Em adição, foi verificado a possível ação

citotóxica do LPS (0,5 µg/mL) sobre a suspensão de células microgлияis. Para isso, após a incubação com EPIT (3,5; 35; 87,5; 175 e 350 µM) ocorreu a adição de LPS (0,5 µg/mL).

O ensaio foi realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform, Minas Gerais, Brasil), que possui como fundamento a medida do decréscimo da absorvância da amostra, devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade de LDH na amostra. Após 24 horas, o sobrenadante das células foi colocado em contato com o substrato de tal enzima e imediatamente ocorreu a leitura da absorvância em 340 nm nos tempos de 1 e 3 minutos, a 37 °C. A atividade da enzima LDH no meio extracelular, foi calculada seguindo as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A1 - A2) / 2] \times 1507,3$$

Onde:

A = atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A1 = absorvância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A2 = absorvância final (3 minutos) em 340 nm;

1507,3 = fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

#### • *Teste do MTT*

Dando continuidade na avaliação da citotoxicidade de EPIT foi realizado o teste do Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Tal ensaio é extensivamente empregado na pesquisa de citotoxicidade de novos materiais pois avalia essencialmente a função metabólica da célula, através da redução do sal de MTT a sal de formazan, conversão realizada pelo complexo enzimático succinato-tetrazol redutase, presente na cadeia respiratória da mitocôndria (MOSMANN, 1983). Sendo assim, células da linhagem BV2, a uma população de  $1 \times 10^5$  células/mL foram adicionadas a uma placa de 96 poços. Decorrida 1 hora do plaqueamento, a suspensão de células foi incubada com concentrações crescentes (3,5; 35; 87,5; 175 e 350 µM) de EPIT; com o grupo veículo/RPMI (a FBS 1% e DMSO 0,1%) e com Triton x-100 (0, 01% - padrão citotóxico). Da mesma forma do ensaio da atividade da enzima LDH, também foi verificado a possível ação citotóxica do LPS (0,5 µg/mL). Sendo assim, após a incubação com EPIT (3,5 - 350 µM) ocorreu a adição de LPS (0,5 µg/mL).

Após 24 horas, foi adicionado à suspensão de células o sal do brometo de MTT - 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, na concentração de 0,5 mg/mL. Passados 90 minutos de incubação, a placa foi centrifugada a 800g e o sobrenadante obtido descartado. Por

fim, foram adicionados 150µL de DMSO para a solubilização do sal de formazan metabolizado. A placa passou por agitação constante durante 15 minutos com o auxílio de um agitador, e a absorbância foi então medida em leitor de microplacas a 560 nm (MOSMANN, 1983). O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

#### ***4.5.3 Determinação do efeito da EPIT sobre o óxido nítrico (NO) mensurado indiretamente pela produção de nitrito em células BV2 expostas ao LPS***

Para avaliar o efeito de EPIT sobre a produção de óxido nítrico (NO), células microgliais da linhagem BV2 ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram adicionadas a uma placa de 96 poços. Decorrida 1 hora do plaqueamento, as células foram incubadas com a EPIT (3,5; 35; 87,5; 175 e 350 µM), com o grupo veículo/RPMI (FBS 1%, DMSO 0,1 %), com o grupo LPS (RPMI1640 a FBS 1 % e DMSO 0,1 %) e com quercetina (20 µM), flavonoide antioxidante padrão. Passada 1 hora de incubação, foi adicionada à suspensão de células, LPS a uma concentração de 0,5 µg/mL visando estimular a produção de NO.

Após 24 horas, foram coletados 100 µL do sobrenadante de cada poço, que foram posteriormente transferidos para uma nova placa de 96 poços. Ao sobrenadante obtido, foi adicionado 100 µL do reagente de Griess (proporção 1:1 de sulfanilamida 1% diluída em ácido fosfórico 5%, e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1% diluído em água ultrapurificada). A curva padrão utilizada para a determinação da concentração de nitrito nos grupos experimentais, foi feita utilizando-se nitrito de sódio (1 µM - 100 µM) (GREEN *et al.*, 1982). O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

#### ***4.5.4 Avaliação do efeito da EPIT sobre os níveis de interleucinas (IL-1β, IL-6 e IL-10) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α)***

Para investigação de um possível efeito anti-inflamatório e imunomodulador da EPIT sobre os níveis de citocinas, células BV2, a uma população de  $1 \times 10^6$  células/mL, foram cultivadas em placas de 96 poços; após 1 hora de plaqueamento, as células foram incubadas com EPIT, na concentração de 87,5 µM, devido à ausência de efeitos tóxicos e potencial anti-inflamatório equivalente às demais concentrações estudadas (175 e 350 µM). Ademais, as células também foram incubadas com o grupo veículo/RPMI (a FBS 1% e DMSO 0,1%), com o grupo LPS (RPMI1640 a FBS 1% e DMSO 0,1%) e com quercetina (20 µM), flavonoide anti-inflamatório padrão. Decorrida 1 hora de tratamento com as substâncias testes, a indução da inflamação foi realizada com a adição do LPS (0,5 µg/mL).

Após 24 horas, o sobrenadante foi então coletado e os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , avaliados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (*BD Biosciences – San Diego, CA, USA e R&D Systems – Minnesota, MN, USA*). A densidade óptica foi medida a uma absorvância de 450 nm utilizando leitor de microplacas (WOO *et al.*, 2003). O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

#### ***4.5.5 Efeito de EPIT sobre receptores transmembrana de polarização microglial (TLR4/TREM2) e sobre vias de sinalização intracelulares (iNOS, NF- $\kappa$ B, MAPKs)***

##### ***Preparo da amostra***

Visando investigar o efeito de EPIT sobre receptores transmembrana de polarização microglial (TLR4/TREM2) e sobre vias de sinalização intracelulares (iNOS, NF- $\kappa$ B, MAPKs) a suspensão de células ( $1 \times 10^6$  células/mL) foi cultivada em placa de 24 poços; após 1h de plaqueamento, as células foram incubadas com EPIT (87,5  $\mu$ M), com o grupo veículo/RPMI (a FBS 1% e DMSO 0,1%) e com o grupo LPS (RPMI1640 a FBS 1%, DMSO 0,1%) durante 1 hora. Em seguida, a indução da resposta inflamatória com LPS após o tratamento com EPIT para investigação de eventos de fosforilação (NF- $\kappa$ B, MAPKs, TLR4) foi de 1 hora e para os demais alvos moleculares (iNOS, TREM2) 24 horas de estimulação.

##### ***• Preparo do conteúdo proteico total***

Para a obtenção do homogenato proteico total, as células foram extraídas da placa de 24 poços com o auxílio de solução salina tamponada (PBS) gelada, após isso, os tubos falcons contendo a suspensão de células foram centrifugadas a 130 g por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o pellet de células obtido, lisado por 30 minutos, pela adição da solução de lise, contendo o tampão de ensaio de imunoprecipitação RIPA (Tris-HCl 40 mM, cloreto de sódio 150 mM, Triton x-100 0,1%, desoxicolato de sódio 0,5% e SDS 0,1%, pH 8,0), inibidores de protease (P2714, *Sigma-Aldrich, New York, USA*) e fosfatase (ab201112, *Abcam®, Cambridge, UK*). Por fim, o homogenato foi então centrifugado a 12000g por 10 minutos, a 4 °C, em ultracentrífuga. O pellet contendo os restos celulares foi descartado e o sobrenadante rico em proteínas, armazenado a -80°C.

A concentração de proteínas foi determinada utilizando o kit BCA (*BioRad Laboratories, CA, USA*), onde o BSA (albumina do soro bovina) serviu como padrão da concentração proteica. Prontamente, a concentração proteica das amostras, foi então normalizada, através da adição do tampão *LaemmLi* (glicerol 40%, SDS 2%, Tris-HCl 0.2M e 0,005% azul de Coomassie, pH 6,8) (ABRAHAM *et al.*, 2015; DAI *et al.*, 2015).

A eletroforese em gel foi utilizada para a separação das proteínas por tamanho (SDS-PAGE, gel de acrilamida a 10%), sendo estas ao final da corrida, eletricamente transferidas para membranas de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF - *BioRad Laboratories, CA, USA*). Após a etapa de transferência, as membranas foram bloqueadas utilizando-se leite desnatado ou BSA a 5%, dissolvidos em tampão Tris-Tween 20 (TBS-T) por 1 hora.

Em seguida, as membranas foram então incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos primários: anti-iNOS 1:3000 (ab16635, *Abcam*®, *Cambridge, UK*), anti-TLR4 1:500 (482300, *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), anti-TREM2 1:500 (PA587933, *Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), anti- $\beta$ -actina 1:100 (ab8226, *Abcam*®, *Cambridge, UK*), anti-p-NF- $\kappa$ B 1:1000 (#3033S, *Cell signaling Technology*®, *Danvers, MA, USA*), anti-NF- $\kappa$ B total 1:1000 (#6956S, *Cell signaling Technology*®, *Danvers, MA, USA*), anti-p-JNK 1:1000 (#9255S, *Cell signaling Technology*®, *Danvers, MA, USA*), anti-JNK total 1:2000 (#9252S, *Cell signaling Technology*®, *Danvers, MA, USA*), anti-p-ERK1/2 1:1000 (#9101S, *Cell signaling Technology*®, *Danvers, MA, USA*) e anti-ERK1/2 total 1:1000 (ab17526, *Abcam*®, *Cambridge, UK*) a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T 1x, e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo (#170-6516, *BioRad Laboratories, CA, USA*) ou anti-coelho (SAB3700956500, *Sigma-Aldrich, New York, USA*) conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP 1:3000) por 2 horas.

As bandas imunorreativas foram então reveladas por quimioluminescência em fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)*, através da adição do reagente de detecção (*Western Blot Clarity™ ECL, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*). As densidades ópticas das bandas foram mensuradas pelo software *Image Lab™ 5.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)*. O ensaio foi realizado em quintuplicata biológica.

#### 4.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 6.0 (*GraphPad Software, San Diego, USA*). Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). A análise da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por análise de variância (one-way ou two-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferoni. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

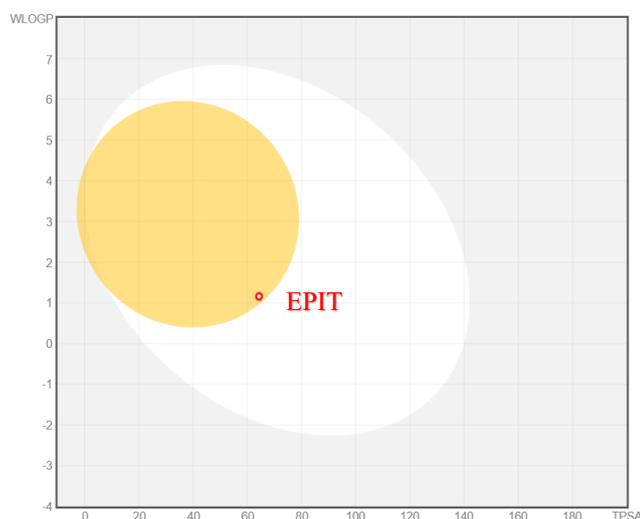
## 5 RESULTADOS

### 5.1. Predição estimada da permeação cerebral e intestinal (*BOILED-EGG*) de EPIT

A representação gráfica do modelo *BOILED-Egg* para EPIT está apresentada na **figura 8**. Como constatado, EPIT demonstrou de forma preditiva, probabilidade em penetrar a BHE, pois ficou localizada na região amarela “gema” do *BOILED-egg*. Destaca-se ainda, que a predileção de EPIT em penetrar o SNC, constatada pela plataforma Swiss ADME, não exclui a possibilidade de parâmetros adequados em relação a absorção gastrointestinal desse alcaloide, representada pela região branca do *BOILED-egg*.

Os resultados obtidos com o auxílio do modelo de predição de propriedades farmacocinéticas, proporcionaram maior convicção para o seguimento do estudo, visto o estabelecimento racional do delineamento experimental, que visa evidenciar de forma inédita ação anti-inflamatória dessa molécula em células imunes do SNC (microglia). Com isso, o estudo teve seguimento com avaliação da citotoxicidade e atividade anti-inflamatória desse alcaloide em células da linhagem BV-2.

**Figura 8** - Representação esquemática do modelo BOILED-EGG para EPIT



Fonte: Swiss ADME

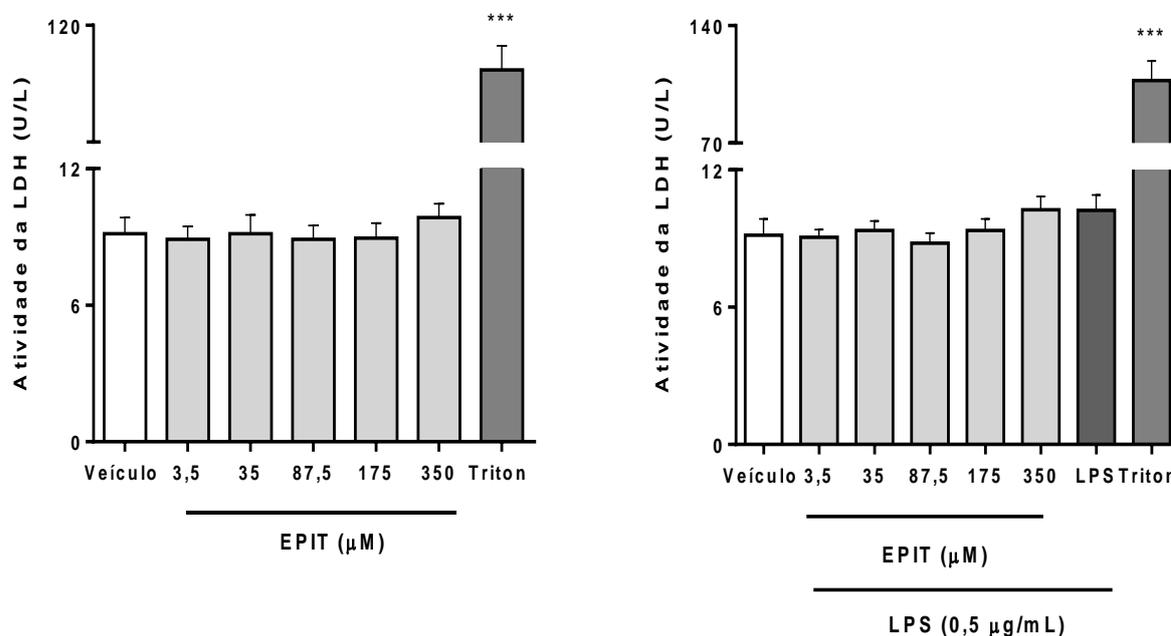
## 5.2 Estudo Farmacológico

### 5.2.1 Avaliação da citotoxicidade da EPIT sobre células microgliais da linhagem BV-2

#### • EPIT não interfere na atividade da enzima LDH

O efeito da EPIT sobre a atividade da enzima LDH está representado na **figura 9 (A e B)**. A adição de concentrações crescentes de EPIT (3,5; 35; 87,5; 175 e 350  $\mu\text{M}$ ) não aumentou significativamente a atividade da enzima LDH ( $8,8 \pm 0,5$ ;  $9,1 \pm 0,8$ ;  $8,8 \pm 0,6$ ;  $8,9 \pm 0,6$  e  $9,8 \pm 0,6$  U/L respectivamente) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1 %:  $9,1 \pm 0,7$  U/L) (**figura 9A**). A adição de LPS (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) também não se mostrou capaz de elevar os níveis dessa enzima ( $10,2 \pm 0,6$ ) quando comparado o grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1 %:  $9,1 \pm 0,7$  U/L). Células pré-tratadas com EPIT (3,5; 35; 87,5; 175 e 350  $\mu\text{M}$ ) e que sofreram posterior adição de LPS (0,5  $\mu\text{g/mL}$ , indutor da ativação microglial) também não apresentaram alteração estatisticamente significativa na atividade da enzima LDH ( $9,0 \pm 0,3$ ;  $9,3 \pm 0,4$ ;  $8,7 \pm 0,4$ ;  $9,3 \pm 0,5$  e  $10,2 \pm 0,5$  U/L respectivamente) (**figura 9B**) em relação ao grupo veículo/RPMI. Por sua vez, o padrão citotóxico (Triton x-100 0,01 % v/v), aumentou significativamente a atividade de LDH, em aproximadamente 10 vezes quando comparada aos níveis do grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1 %:  $9,1 \pm 0,7$  U/L) nos experimentos envolvendo a ausência ( $100,9 \pm 10,2$  U/L) e a presença do LPS ( $107,2 \pm 11,7$  U/L), ratificando dessa forma a sensibilidade do modelo na percepção da toxicidade de materiais.

**Figura 9** - Efeito de EPIT sobre a atividade da enzima LDH em células microgliais de linhagem BV2 na ausência (A) e presença (B) de LPS



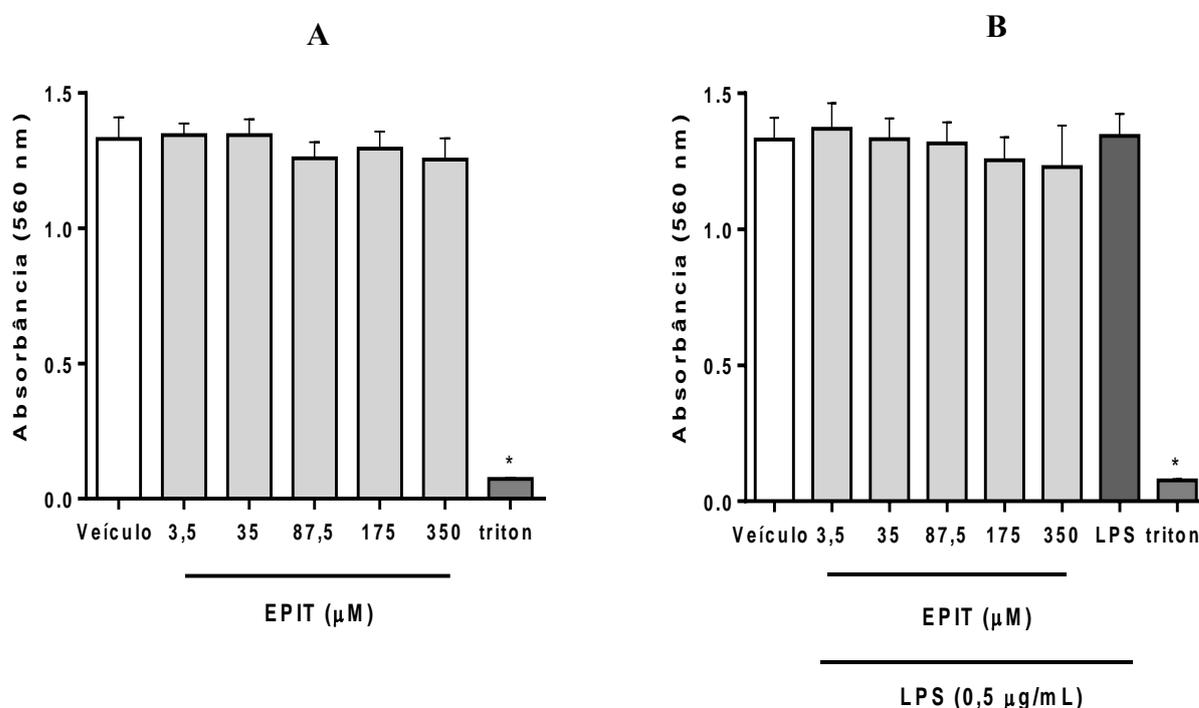
Legenda: LPS (0,5 µg/mL); Triton x-100 (0,01% v/v). Os resultados estão expressos como média ± E.P.M (n=5) da atividade da enzima LDH. \* vs veículo/RPMI (p<0,05 – one-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

- ***EPIT não altera o metabolismo de células microgliais através do teste do MTT***

O efeito da EPIT sobre a viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT está representado na **figura 10 (A e B)**, respectivamente. A adição de concentrações crescentes de EPIT (3,5; 35; 87,5; 175 e 350 µM) à suspensão de células BV2 não reduziu de forma significativa a viabilidade celular (Abs 560 nm: 1,3 ± 0,04; 1,3 ± 0,05; 1,2 ± 0,05; 1,2 ± 0,06; 1,2 ± 0,06, respectivamente) (**figura 10A**) quando comparada ao grupo veículo/RPMI (Abs 560 nm: 1,3 ± 0,08). O LPS adicionado 1 hora após o pré-tratamento com EPIT, também não alterou a viabilidade celular (Abs 560 nm: 1,3 ± 0,08) quando comparado com o grupo veículo/RPMI (Abs 560 nm: 1,3 ± 0,08), bem como não interferiu de forma estatisticamente significativa no comportamento de EPIT (3,5; 35; 87,5; 175 e 350 µM) frente a viabilidade de células da linhagem BV2 (Abs 560 nm: 1,3 ± 0,09; 1,3 ± 0,07; 1,3 ± 0,07; 1,2 ± 0,08; 1,2 ± 0,15 respectivamente) (**figura 10B**). Por sua vez, o Triton x-100 (0,01% v/v, padrão citotóxico), reduziu a viabilidade celular quando comparado ao grupo veículo/RPMI em um percentual de aproximadamente 95 % nos experimentos envolvendo a ausência (Abs 560 nm: 0,07 ± 0,004) e a presença do LPS (Abs 560 nm: 0,07 ± 0,005).

Os dados obtidos no ensaio do MTT aliados aos resultados encontrados nos ensaios da atividade da enzima LDH, colocam o LPS (estímulo inflamatório proposto) como um agente capaz de ocasionar a ativação microglial sem alterar a viabilidade celular. Dessa forma, os resultados obtidos, demonstraram que a EPIT nas condições investigadas não afeta a viabilidade das células microgliais, o que orientou o prosseguimento dos estudos de avaliação do efeito anti-inflamatório/imunomodulador desse alcaloide imidazólico em células BV2 expostas ao LPS.

**Figura 10** - Efeito de EPIT sobre a viabilidade de células microgliais (linhagem BV2) avaliada pelo teste do MTT na ausência (A) e presença (B) de LPS



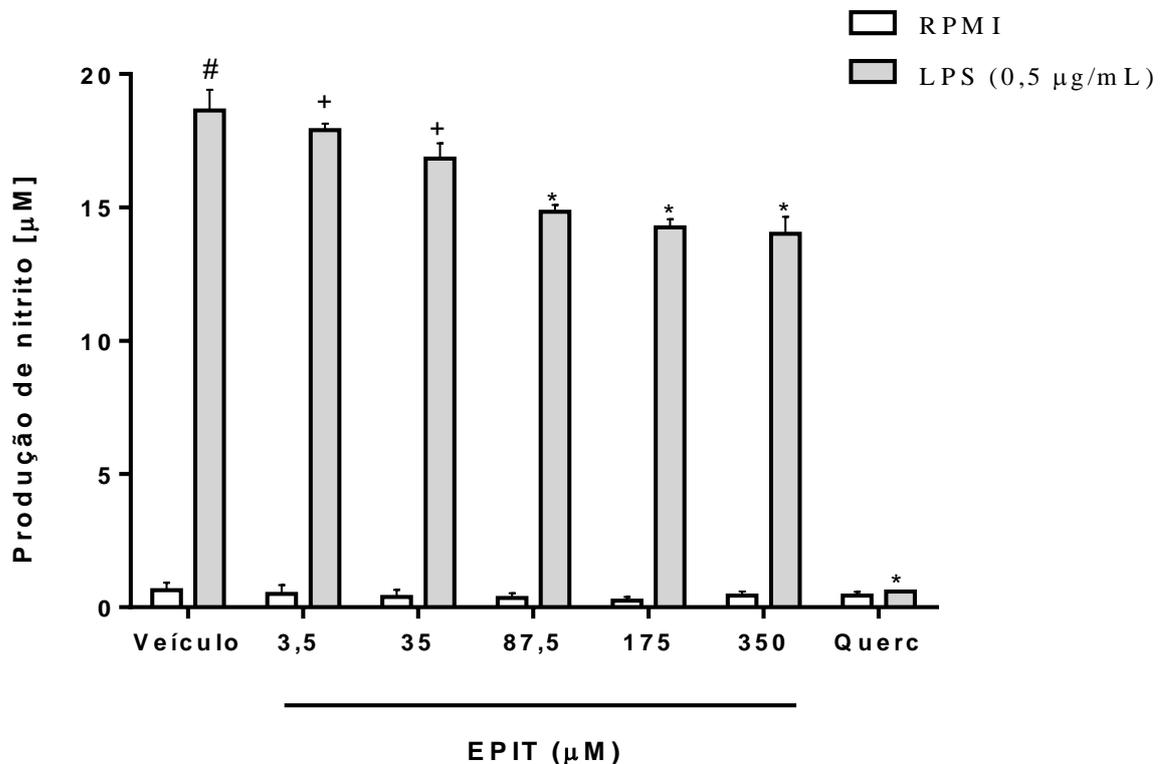
Legenda: LPS (0,5 µg/mL); Triton x-100 (0,01% v/v). Os resultados estão expressos como média ± E.P.M (n=5) da absorbância (560 nm). \* vs veículo/RPMI (p<0,05 – one-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

### 5.2.2 EPIT reduz a produção de óxido nítrico/nitrito em células BV2 expostas ao LPS

O efeito da EPIT sobre a produção de óxido nítrico indiretamente equivalente a produção de nitrito em células BV2 expostas ao LPS, está representado na **Figura 11**. A adição de LPS (0,5 µg/mL) sobre as células microgliais, se mostrou capaz de aumentar significativamente a produção de nitrito ( $18,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1%:  $0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ). O tratamento prévio com EPIT nas concentrações de 87,5, 175 e 350 µM, reduziu parcialmente, e de maneira significativa a produção de nitrito

( $14,8 \pm 0,2$ ;  $14,2 \pm 0,3$ ;  $14,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ , respectivamente) quando comparado ao grupo LPS ( $18,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ). As maiores reduções da concentração de nitrito proporcionado por EPIT estiveram em torno de 25 % ( $\pm 3,3 - 350 \mu\text{M}$ ). Concentrações menores ( $3,5$  e  $35 \mu\text{M}$ ) não se mostraram capazes de diminuir significativamente a produção de nitrito ( $17,9 \pm 0,2$ ;  $16,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ , respectivamente) quando comparadas ao grupo LPS ( $18,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ). O pré-tratamento com quercetina ( $20 \mu\text{M}$ ), flavonol anti-inflamatório utilizado como substância padrão, preveniu a produção de nitrito ( $0,59 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) ocasionada pelo LPS ( $0,5 \mu\text{g/mL}$ ) não diferindo estatisticamente do grupo veículo/RPMI. A adição de EPIT ( $3,5$ ;  $35$ ;  $87,5$ ;  $175$  e  $350 \mu\text{M}$ ) e quercetina ( $20 \mu\text{M}$ ) *per se*/células que não receberam a estimulação do LPS não alterou significativamente os níveis nitrito ( $0,5 \pm 0,3$ ;  $0,3 \pm 0,1$ ;  $0,3 \pm 0,1$ ;  $0,2 \pm 0,1$ ;  $0,4 \pm 0,1$ ;  $0,44 \pm 0,1 \mu\text{M}$ , respectivamente) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (DMSO  $0,1\%$ :  $0,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ).

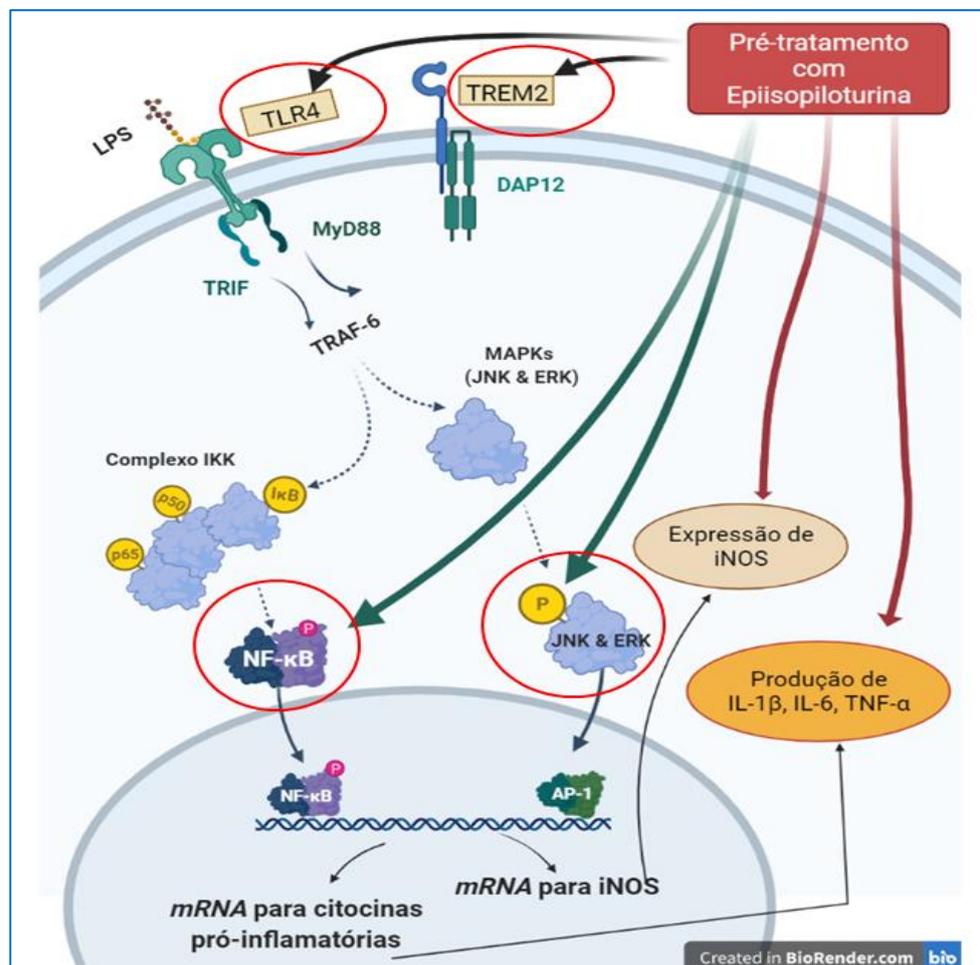
**Figura 11** - Efeito de EPIT sobre a produção de nitrito em células BV2 expostas ao LPS



Legenda: Querc:  $20 \mu\text{M}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M ( $n=5$ ) da produção de nitrito ( $\mu\text{M}$ ). # vs veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS. + vs EPIT  $87,5 \mu\text{M}$  + LPS ( $p < 0,05$  – two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

Os resultados obtidos na avaliação preliminar da permeação cerebral (*in silico*) da EPIT, a ausência da citotoxicidade (atividade da enzima LDH e teste do MTT) mostrada por esse alcaloide e o potencial anti-inflamatório apresentado pelo mesmo ao reduzir significativamente a concentração de óxido nítrico/nitrito no status inflamatório induzido pelo LPS em células microgлияis da linhagem BV2, motivaram-nos a prosseguir o estudo do efeito anti-inflamatório da EPIT em células microgлияs. Dessa forma, o estudo prosseguiu com a avaliação do efeito do alcaloide na produção de outros mediadores, citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatória, bem como com a pesquisa do possível mecanismo de ação molecular, incluindo a avaliação do efeito sobre a expressão de iNOS, de receptores (TLR4 e TREM2) e o papel das vias de sinalização NF- $\kappa$ B e MAPKs (**figura 12**). Com base nos resultados até então obtidos, a concentração de EPIT selecionada para prosseguirmos os estudos foi de 87,5  $\mu$ M, considerando que seu efeito anti-inflamatório/sobre a produção de nitrito foi comparável, não diferindo estatisticamente de concentrações superiores (EPIT 175 e 350  $\mu$ M).

**Figura 12** - Estudo do mecanismo de ação anti-inflamatório de EPIT sobre células microgлияs expostas ao LPS



Fonte: autoria própria, figura feita na plataforma digital Biorender. Legenda: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ); interleucina (IL); proteína ativadora de DNAX (DAP12); proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs); receptor desencadeado expresso nas células mieloides 2 (TREM2); receptor do tipo Toll like (TLR4).

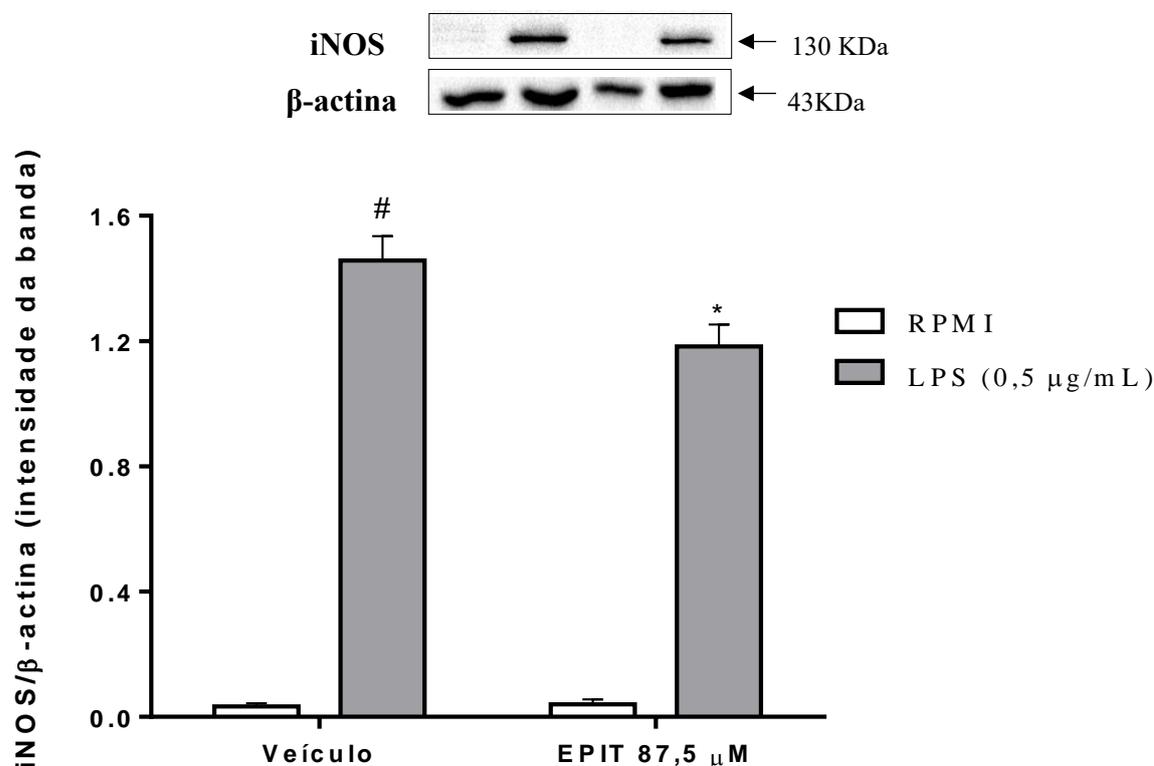
### **5.2.3 EPIT reduz a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)**

Prosseguindo os estudos, foi investigado se a redução da produção de óxido nítrico pela EPIT, estaria relacionado a uma ação sobre a enzima responsável pela sua biossíntese (iNOS). A **figura 13** mostra o efeito de EPIT sobre a expressão de iNOS em células BV2.

A indução do estado pró-inflamatório pela adição de LPS (0,5  $\mu$ mL) aumentou de forma significativa a expressão da óxido nítrico sintase (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $1,4 \pm 0,07$ ) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $0,03 \pm 0,01$ ), mostrando o sucesso do protocolo experimental em polarizar o perfil celular para o estado M1.

O pré-tratamento da suspensão de células com EPIT (87,5  $\mu$ M), diminuiu parcialmente a expressão da enzima iNOS (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $1,1 \pm 0,06$ ) quando comparado ao grupo LPS (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $1,4 \pm 0,07$ ), representando um percentual de inibição de aproximadamente 20%. A adição *per se* de EPIT (87,5  $\mu$ M) não interferiu na expressão proteica da iNOS (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $0,05 \pm 0,02$ ), mostrando comportamento semelhante ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda iNOS/ $\beta$ -actina:  $0,03 \pm 0,01$ ).

**Figura 13** - Efeito de EPIT sobre a expressão da iNOS estimulada pelo LPS em células BV2



Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da intensidade da banda de iNOS/b-actina. # vs veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS ( $p < 0,05$  – two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

#### 5.2.4 Efeito de EPIT sobre a produção de citocinas em células microgliais da linhagem BV2 ativadas pelo LPS

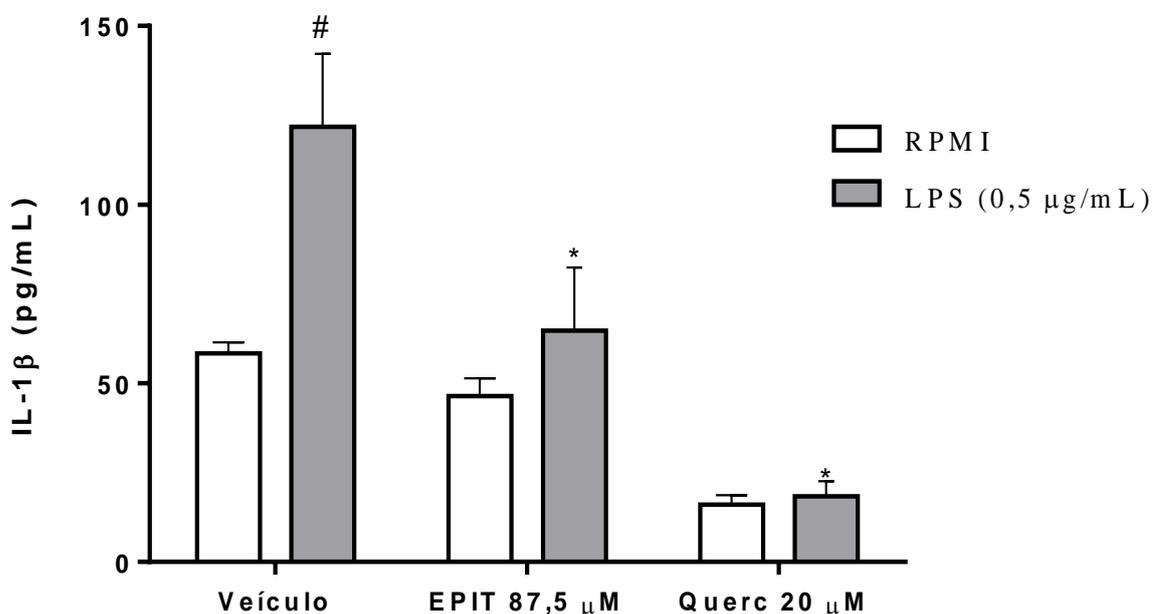
- **EPIT inibe a produção de IL-1 $\beta$**

O efeito da EPIT sobre a concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de células BV2 na ausência e na presença de LPS está representado na **figura 14**. A adição de LPS (0,5 µg/mL) sobre as células induziu o aumento significativo na produção de IL-1 $\beta$  ( $121,0 \pm 20,4$  pg/mL) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1%:  $58,3 \pm 3,0$  pg/mL), evidenciando a formação de um microambiente inflamatório e comprovando, dessa forma, o funcionamento do protocolo experimental.

O pré-tratamento com EPIT (87,5 µM) inibiu a produção de IL-1 $\beta$  ( $64,7 \pm 17,7$  pg/mL) quando comparado ao grupo LPS ( $121,0 \pm 20,4$  pg/mL), resultando na produção deste mediador ao nível encontrado no sobrenadante de células BV2 não estimuladas (grupo veículo/RPMI:  $58,3 \pm 3,0$  pg/mL). A quercetina (20 µM), flavonol anti-inflamatório padrão,

também preveniu o ambiente inflamatório induzido pelo LPS, não diferindo estatisticamente do nível de IL-1 $\beta$  ( $20,1 \pm 4,2$  pg/mL) observado no grupo veículo/RPMI. O pré-tratamento das células com EPIT ( $46,4 \pm 17,7$  pg/mL) e quercetina ( $19,1 \pm 3,7$  pg/mL), sem a estimulação do LPS (*per se*) não alterou significativamente a produção de IL-1 $\beta$  em relação ao grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1%:  $58,3 \pm 3,3$  pg/mL).

**Figura 14** - Efeito de EPIT sobre a produção de IL-1 $\beta$  em células microgliais (linhagem BV2) estimuladas com LPS



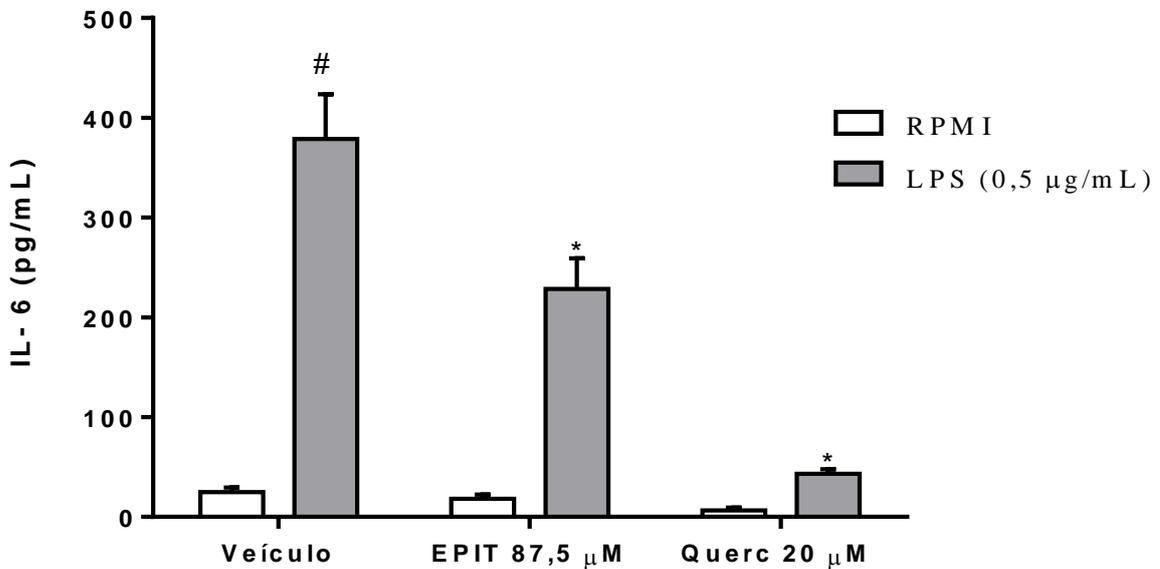
Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da produção de IL-1 $\beta$  (pg/mL). # vs veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS ( $p < 0,05$  – two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

- **EPIT reduz a produção de IL-6**

Seguindo com a investigação do efeito de EPIT sobre a produção de citocinas no ambiente inflamatório, a **figura 15** mostra o efeito desse alcaloide imidazólico sobre o nível de IL-6 no sobrenadante de células BV2 estimuladas ou não com LPS. A adição desse agente (LPS:  $0,5$  μg/mL) aumentou significativamente a produção de IL-6 ( $378,7 \pm 44,9$  pg/mL) quando comparada ao grupo veículo/RPMI (DMSO 0,1 %:  $24,8 \pm 4,5$  pg/mL). Porém, o pré-tratamento com EPIT ( $87,5$  μM) reduziu de forma significativa a produção de IL-6 ( $228,4 \pm 30,6$  pg/mL), diminuindo a produção dessa interleucina em um percentual de aproximadamente 40% quando comparado ao grupo veículo tratado com LPS ( $378,7 \pm 44,9$  pg/mL – 100% de produção de IL-

6). A quercetina (20  $\mu$ M), por sua vez, atenuou o ambiente inflamatório induzido pelo LPS (43,06  $\pm$  4,79 pg/mL), não diferindo estatisticamente do grupo veículo/RPMI (24,8  $\pm$  4,5 pg/mL). A adição *per se* de EPIT (18,3  $\pm$  4,1 pg/mL) ou quercetina (6,6  $\pm$  2,5 pg/mL) não alterou significativamente a concentração de IL-6 quando comparada ao grupo veículo/RPMI (24,8  $\pm$  4,5 pg/mL).

**Figura 15** - Efeito de EPIT sobre a produção de IL-6 em células microgliais (linhagem BV2) estimuladas com LPS



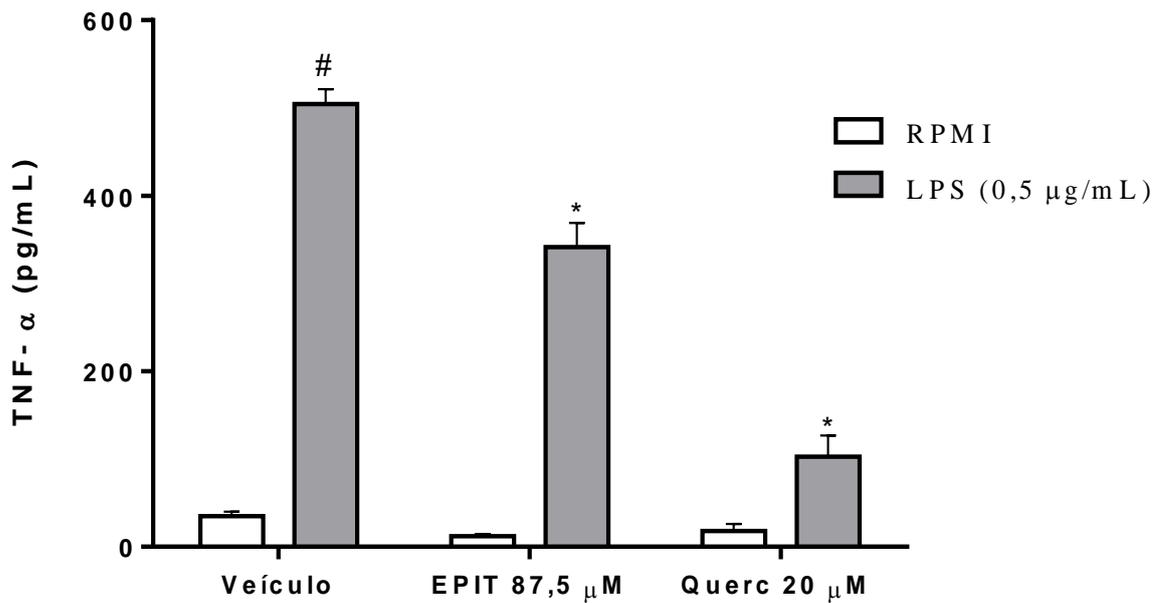
Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da produção de IL-6 (pg/mL).  
<sup>#</sup> vs veículo/RPMI; <sup>\*</sup> vs grupo veículo estimulado com LPS (p<0,05 – two-awy ANOVA e Teste de Bonferroni).

- **EPIT diminui a produção de TNF- $\alpha$**

O efeito de EPIT sobre a produção de TNF- $\alpha$ , outro importante mediador pró-inflamatório, está representado na **figura 16**. De forma semelhante ao visto anteriormente na produção de IL-1 $\beta$  e IL-6, a adição de LPS sobre as células BV2, aumentou de forma significativa a produção de TNF- $\alpha$  (504,2  $\pm$  16,9 pg/mL) quando comparado as células não expostas ao LPS (grupo veículo/RPMI - DMSO 0,1 %: 35,0  $\pm$  4,9 pg/mL). A adição prévia de EPIT (87,5  $\mu$ M) às células, reduziu de maneira significativa a produção dessa citocina (341,5  $\pm$  27,7 pg/mL) quando comparado ao grupo LPS (504,2  $\pm$  16,9 pg/mL), representando um percentual de redução de aproximadamente 34 %. A quercetina (20  $\mu$ M), substância utilizada como padrão anti-inflamatório, reduziu de maneira significativa a produção deste mediador

( $102,5 \pm 24,1$  pg/mL) quando comparada ao grupo estimulado com LPS, de tal forma, que não apresentou diferença estatística ao ser comparado com o grupo RPMI/veículo. O tratamento com EPIT *per se* ( $11,9 \pm 2,6$  pg/mL) ou quercetina ( $17,8 \pm 8,3$  pg/mL) não alterou a produção de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo veículo/RPMI ( $35,0 \pm 4,9$  pg/mL).

**Figura 16** - Efeito de EPIT sobre a produção de TNF- $\alpha$  em células microgliais (linhagem BV2) estimuladas com LPS



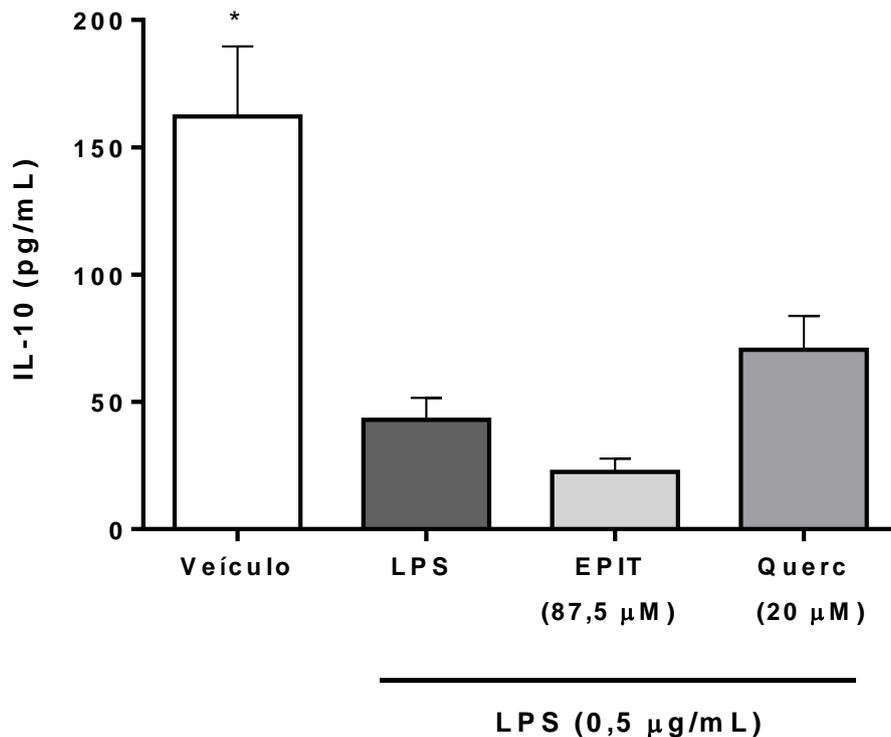
Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da produção de TNF- $\alpha$  (pg/mL). # vs veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS ( $p < 0,05$  – two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

- **EPIT não altera a concentração de IL-10 em células BV2 expostas ao LPS**

Avaliando-se uma possível ação imunomoduladora de EPIT sobre a produção de citocinas anti-inflamatórias, a **figura 17** apresenta o efeito desse alcaloide sobre a produção de IL-10. A adição de LPS ( $0,5$  μg/mL) diminuiu significativamente a concentração de IL-10 ( $43,00 \pm 8,60$  pg/mL) no sobrenadante das células micróglias, quando comparado ao grupo veículo/RPMI ( $162,10 \pm 27,60$  pg/mL), caracterizando uma polarização do perfil M2 (anti-inflamatório) para o perfil M1 (pró-inflamatório). A adição de EPIT ( $87,5$  μM) não se mostrou capaz de elevar a produção de IL-10 ( $22,50 \pm 5,20$  pg/mL), não diferindo estatisticamente do grupo estimulado com LPS ( $43,00 \pm 8,60$  pg/mL). O pré-tratamento com quercetina ( $20$  μM) também não foi capaz de estimular a produção de IL-10 pelas células de linhagem BV2,

mostrando apenas uma tendência ( $70,48 \pm 13,25$  pg/mL) quando comparada ao grupo estimulado com LPS ( $43,00 \pm 8,60$  pg/mL).

**Figura 17** - Efeito de EPIT sobre a produção de IL-10 em células microgliais (linhagem BV2) expostas ao LPS



Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da produção de IL-10 (pg/mL).  
\* vs grupo LPS ( $p < 0,05$  – one-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

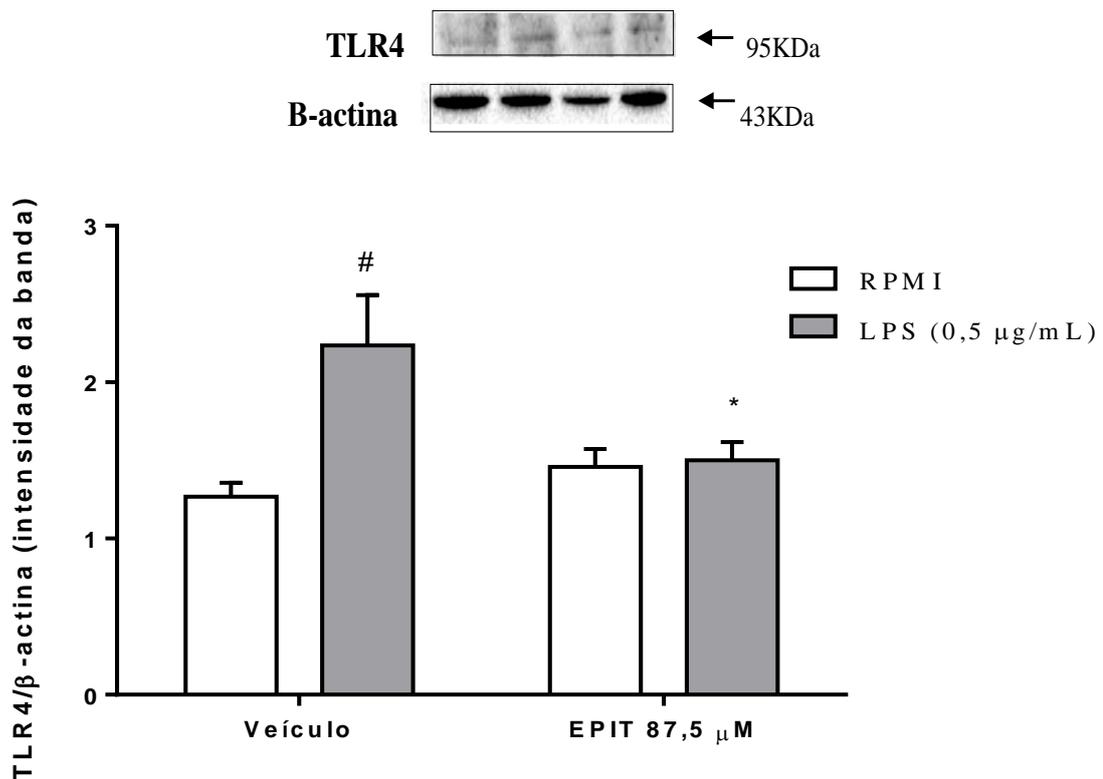
### 5.2.5 O alcaloide imidazólico EPIT reduz a expressão do receptor TLR4, mas não induz o aumento na expressão do TREM2 em células microgliais (linhagem BV2)

A ativação do TLR4 é responsável pelo início da cascata inflamatória ocasionada por diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) incluindo o LPS (CHEN *et al.*, 2012; LU; YEH; OHASHI, 2008). Com isso, o efeito de EPIT sobre esse alvo de ativação microglial está representado na **figura 18**. A estimulação de células microgliais com LPS ( $0,5$  µg/mL) pelo período de 1 hora, mostrou-se capaz de promover o aumento significativo (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina:  $2,2 \pm 0,3$ ) na densidade proteica desse receptor quando comparado ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina:  $1,26 \pm 0,09$ ).

O pré-tratamento das células micróglia com EPIT ( $87,5$  µM) reduziu de maneira significativa o aumento na expressão proteica do TLR4 (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina:

1,3 ± 0,1) quando comparado ao grupo estimulado durante 1 hora com LPS (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina: 2,2 ± 0,3). Por sua vez, o tratamento com EPIT *per se* não alterou a expressão basal desse receptor (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina: 1,36 ± 0,1), mostrando comportamento semelhante ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda TLR4/ $\beta$ -actina: 1,2 ± 0,09).

**Figura 18** - Efeito de EPIT sobre o aumento inicial na expressão do TLR4 em células BV2 tratadas com LPS



Legenda: Os resultados estão expressos como média ± E.P.M (n=5) da intensidade da banda de TLR4/ $\beta$ -actina. # vs veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS ( $p < 0,05$  – Two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

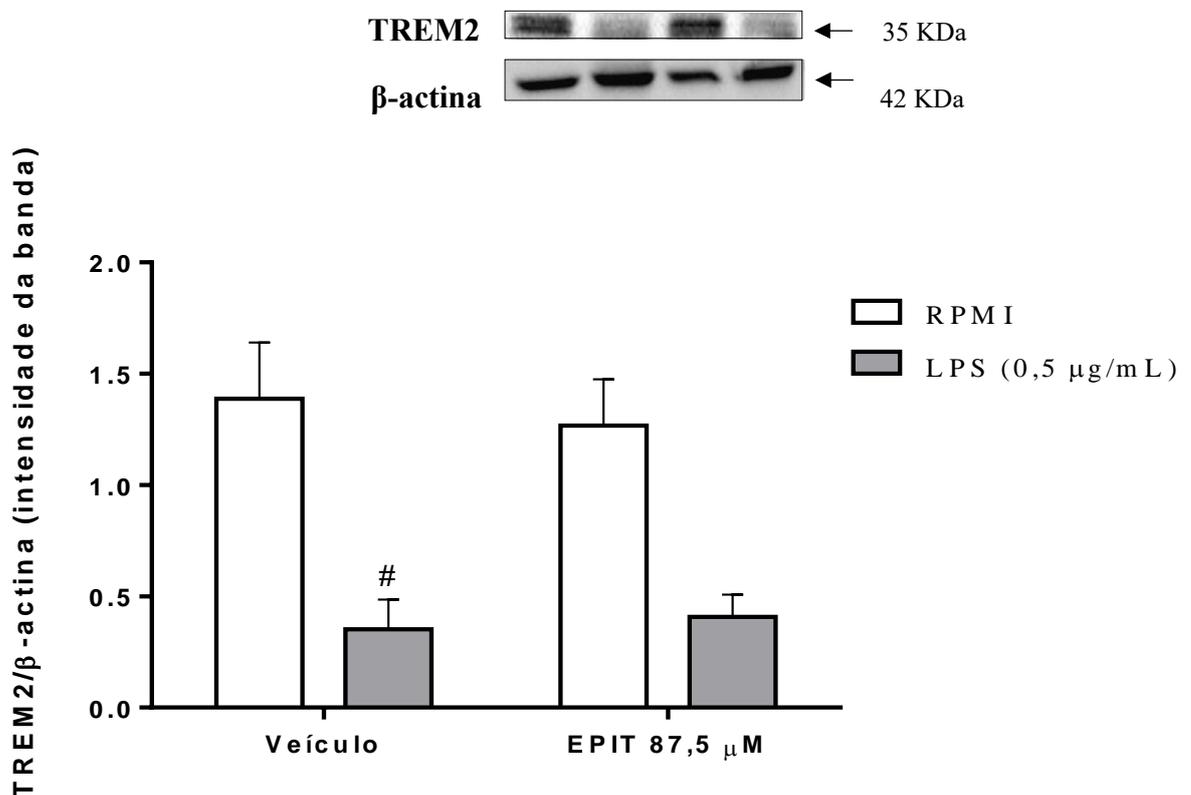
Com o objetivo de identificar uma possível ação imunomoduladora de EPIT a um nível de expressão proteica, a **figura 19** mostra o efeito desse alcaloide sobre o TREM2, um importante receptor imune inato, envolvido em vias de sinalização da neuroregulação (LIU *et al.*, 2020; WALTER, 2016).

A adição de LPS (0,5 μg/mL) à suspensão das células BV2 reduziu a expressão proteica do TREM 2 (intensidade da banda TREM2/ $\beta$ -actina: 0,35 ± 0,1) quando comparada ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda TREM2/ $\beta$ -actina: 1,3 ± 0,2), ratificando o funcionamento do delineamento experimental em induzir o perfil M1, relacionado a redução da

expressão desse receptor.

A adição prévia de EPIT na concentração estudada (87,5  $\mu$ M) não foi capaz de aumentar a expressão proteica do receptor em questão (intensidade da banda TREM2/ $\beta$ -actina:  $0,4 \pm 0,2$ ), apresentando comportamento semelhante ao grupo LPS (intensidade da banda TREM2/ $\beta$ -actina:  $0,3 \pm 0,1$ ). Por sua vez, a adição *per se* de EPIT base (87,5  $\mu$ M) não alterou o funcionamento celular basal (intensidade da banda TREM2/ $\beta$ -actina:  $1,2 \pm 0,2$ ), não diferindo seu comportamento quando comparado ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda TREM2/ $\beta$ -actina:  $1,3 \pm 0,2$ ).

**Figura 19** - Efeito de EPIT sobre a expressão proteica do TREM2 em células BV2 submetidas ao modelo de inflamatório pelo LPS



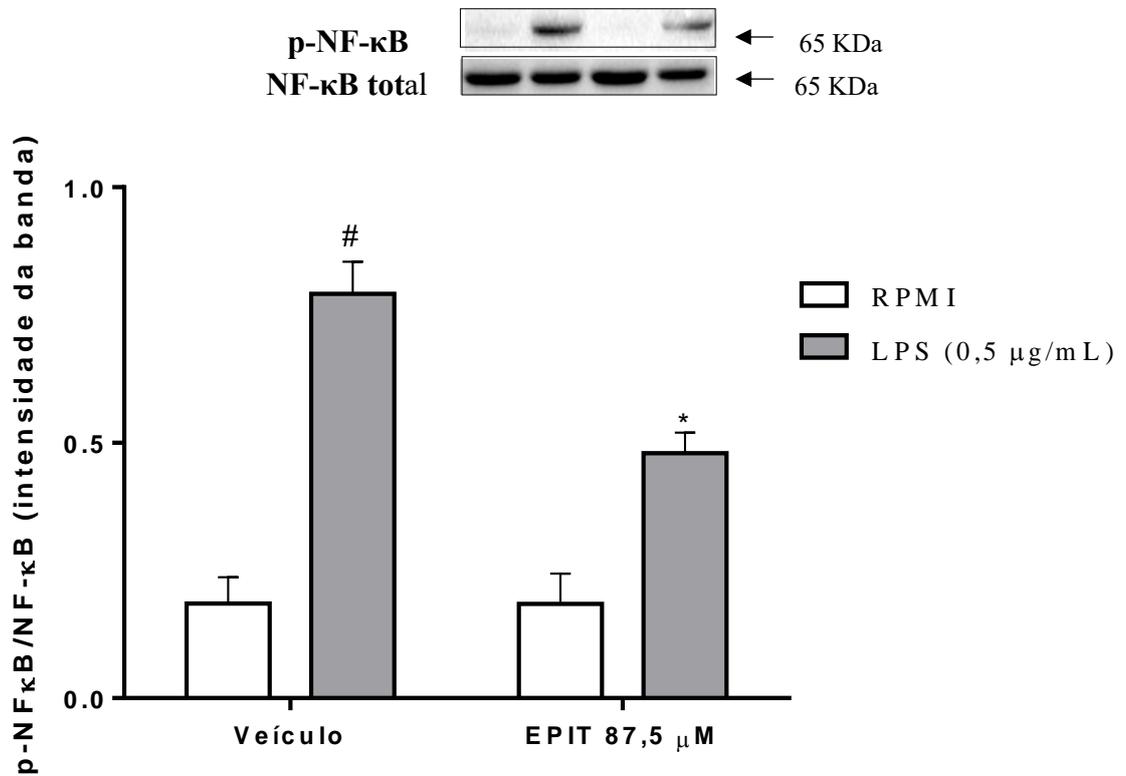
Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da intensidade da banda de TREM2/ $\beta$ -actina. # vs veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS (p<0,05 – Two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

### **5.2.6 O alcaloide imidazólico EPIT exerce seu efeito anti-inflamatório em células microgliais (linhagem BV2) agindo sobre vias de sinalização intracelulares NF- $\kappa$ B/ MAPKs**

- **Ação sobre a via do NF- $\kappa$ B**

A ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B regula diversos mecanismos celulares e está intimamente relacionada com a produção de diversos mediadores inflamatórios (SHIH; WANG; YANG, 2015). A investigação do potencial da EPIT base em diminuir o processo de fosforilação dessa via (subunidade p-65) pode ser observado na **figura 20**. A adição de LPS (0,5  $\mu$ g/mL) promoveu um aumento significativo do processo de fosforilação da subunidade p-65 (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B total:  $0,79 \pm 0,06$ ) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B total:  $0,18 \pm 0,05$ ) representado um aumento de cerca de 4,4 vezes nos eventos de fosforilação da via em questão. A adição de EPIT (87,5  $\mu$ M) sobre às células inibiu de maneira significativa os eventos de ativação dessa via (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B total:  $0,47 \pm 0,04$ ) quando comparada com o grupo estimulado com LPS (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B total:  $0,79 \pm 0,06$ ), resultando em uma inibição da fosforilação de aproximadamente 40%. O tratamento *per se* com EPIT, não alterou o comportamento basal dos eventos de fosforilação (intensidade da banda p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B total:  $0,18 \pm 0,05$ ) quando comparado ao grupo veículo/RPMI.

**Figura 20** - Efeito de EPIT sobre a via do NF- $\kappa$ B em células BV2 estimuladas com LPS



Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) intensidade da banda de p-NF- $\kappa$ B/ NF- $\kappa$ B total. # vs veículo RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS (p<0,05 – Two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

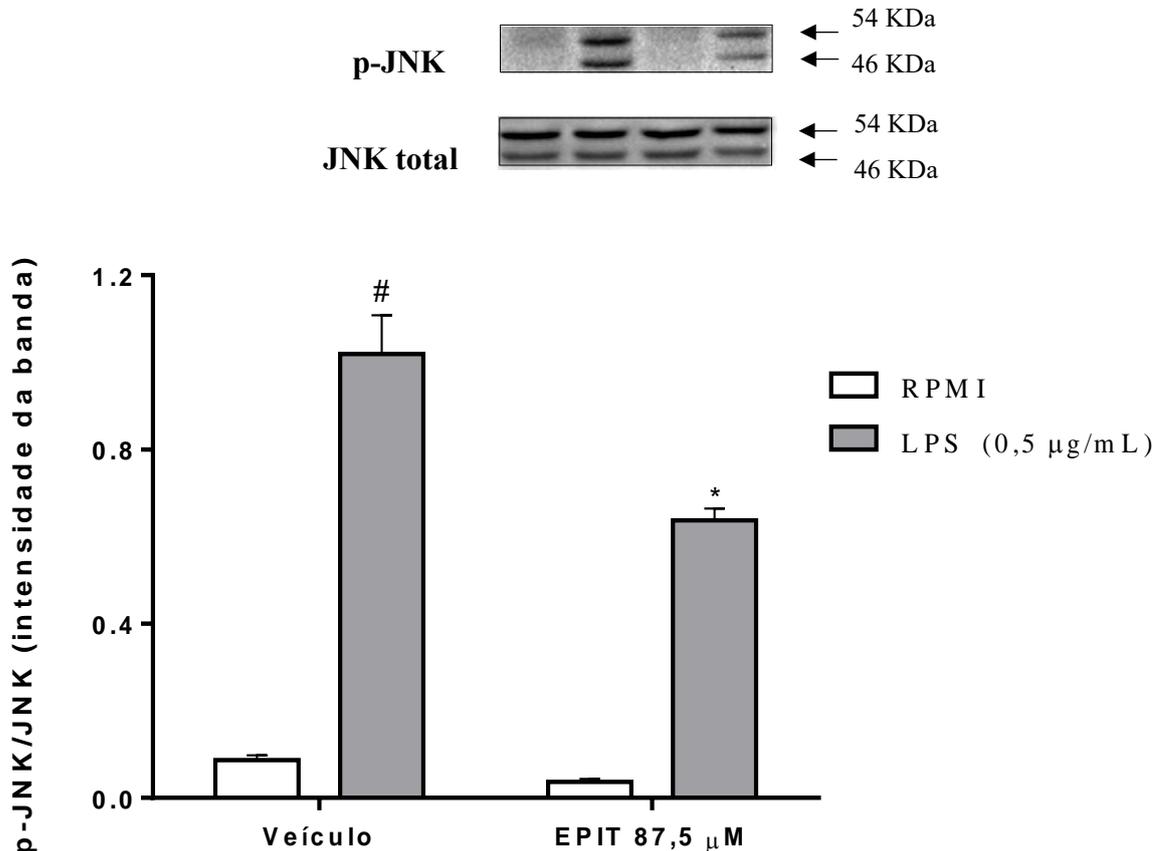
• **Efeito de EPIT sobre a via das MAPKs: atividade sobre a proteína JNK**

Prosseguindo os estudos, foi investigado o papel da via MAPKs/JNK no efeito anti-inflamatório de EPIT em células BV2. A **figura 21** apresenta a ação do alcaloide sobre a fosforilação da proteína Cinase JNK, representante da via das MAPKs e responsável pela regulação de diversos processos biológicos, incluindo a produção mediadores inflamatórios (POPIOLEK-BARCZYK; MIKA, 2016).

A estimulação das células BV2 com a adição de LPS (0,5  $\mu$ g/mL) aumentou de maneira significativa o processo de fosforilação da proteína Cinase JNK (intensidade da banda p-JNK/JNK total:  $1,0 \pm 0,01$ ) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda p-JNK/JNK total:  $0,08 \pm 0,01$ ). O pré-tratamento com EPIT base (87,5  $\mu$ M) reduziu em um percentual de 39% a fosforilação de tal proteína (intensidade da banda p-JNK/JNK total:  $0,63 \pm 0,01$ ) quando comparada ao grupo estimulado com LPS (intensidade da banda p-JNK/JNK total:  $1,0 \pm 0,01$ ), constando dessa forma, atividade sobre outra via de sinalização intracelular.

A adição *per se* de EPIT (87,5  $\mu$ M) não alterou o funcionamento do processo de fosforilação da Cinase JNK ( $0,03 \pm 0,006$ ) quando comparada ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda p-JNK/JNK total:  $0,08 \pm 0,01$ ).

**Figura 21** - Efeito de EPIT sobre a fosforilação da proteína JNK em células BV2 submetidas a ativação pelo LPS



Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da intensidade da banda de p-JNK/ JNK total. # vs veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS ( $p < 0,05$  – Two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

- **Efeito de EPIT sobre a via das MAPKs: atuação sobre a fosforilação da proteína ERK1/2**

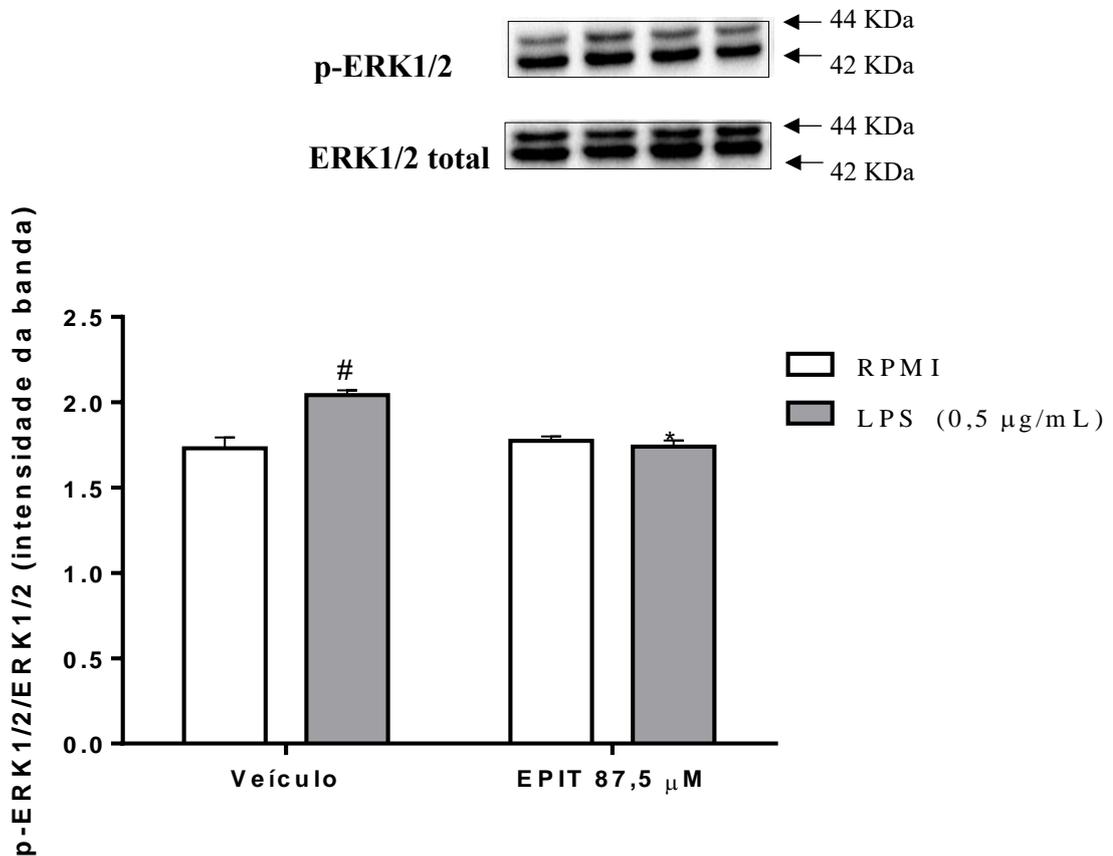
Dando seguimento ao estudo do efeito de EPIT sobre a via das MAPKs, a **figura 22** apresenta o envolvimento desse alcaloide sobre a fosforilação da proteína Cinase ERK 1/2, alvo molecular responsável pela migração, diferenciação e sobrevivência celular, além de outros eventos metabólicos importantes (MOENS; KOSTENKO; SVEINBJØRNSSON, 2013).

A adição de LPS (0,5  $\mu$ g/mL) sobre as células BV2 aumentou o processo de fosforilação da proteína ERK1/2 (intensidade da banda p-ERK1/2/ ERK1/2 total:  $2,0 \pm 0,02$ ) quando comparado ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda p-ERK1/2/ ERK1/2 total:  $1,73 \pm 0,06$ ) constatando o funcionamento do LPS em ocasionar o processo de ativação da via

em questão um nível molecular.

O pré-tratamento com EPIT (87,5  $\mu\text{M}$ ) inibiu o processo de fosforilação dessa proteína (intensidade da banda p-ERK1/2/ ERK1/2 total:  $1,74 \pm 0,03$ ) restabelecendo os eventos celulares ao nível encontrado no grupo veículo/RPMI (intensidade da banda p-ERK1/2/ ERK1/2 total:  $1,73 \pm 0,06$ ). A adição de EPIT (87,5  $\mu\text{M}$ ) *per se* não alterou o funcionamento celular basal (intensidade da banda p-ERK1/2/ ERK1/2 total:  $1,77 \pm 0,02$ ), não diferindo seu comportamento quando comparado ao grupo veículo/RPMI (intensidade da banda p-ERK1/2/ERK1/2 total:  $1,73 \pm 0,06$ ).

**Figura 22** - Efeito de EPIT sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 em células BV2 na presença do LPS



Legenda: Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5) da intensidade da banda de p-ERK1/2/ ERK1/2 total. # vs grupo veículo/RPMI; \* vs grupo veículo estimulado com LPS ( $p < 0,05$  – Two-way ANOVA e Teste de Bonferroni).

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram evidenciar que o alcaloide imidazólico EPIT de *P. mycophyllus* (jaborandi) demonstra alta probabilidade em permear a BHE através de dados gerados em análise farmacocinética preditiva. A avaliação farmacológica constatou a ausência de citotoxicidade dessa molécula, bem como demonstrou de maneira inédita seu efeito anti-inflamatório em células microgлияis (linhagem BV2) através da redução na produção de mediadores inflamatórios, ação mediada em parte, pela capacidade dessa molécula em inibir vias de sinalização intracelulares e a resposta imune ocasionada pela ativação do receptor transmembrana TLR4, apresentando dessa forma, um mecanismo de ação molecular dependente da via TLR4/NF- $\kappa$ B/MAPKs/iNOS. Ademais, EPIT não se mostrou capaz, nas condições investigadas, de estimular mecanismos anti-inflamatórios (produção de IL-10 e expressão do TREM2). Com isso, destacamos o potencial desse alcaloide como uma fonte de estudo promissora em modelos *in vivo* que buscam alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que acometem o SNC, onde a ativação microglial possui um papel importante.

Modelos *in silico* de predição de características farmacocinéticas, são cada vez mais utilizados pela indústria farmacêutica, em busca de otimização de tempo e recursos financeiros (TSAIOUN; BLAAUBOER; HARTUNG, 2016). Com isso, a análise de parâmetros farmacocinéticos, comumente referidos como ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), é um passo industrial comum a várias moléculas em estudo bioprospectivos, sendo o parâmetro de biodisponibilidade um desafio constante para a indústria no desenvolvimento de fármacos (HANN; SIMPSON, 2014).

A plataforma Swiss ADME dispõe de ferramentas que indicam a probabilidade de moléculas candidatas a fármacos em penetrar no SNC, através da correlação de sua lipofilicidade com a sua área de superfície polar (TPSA). Sendo assim, tal recurso pode ser útil na fase inicial do processo de triagem farmacológica (DAINA; ZOETE, 2016). A EPIT mostrou-se capaz de atravessar a BHE de acordo com o método de *BOILED-egg* presente nesta plataforma. Um estudo desenvolvido por Rocha e colaboradores (2018), utilizando a plataforma online Pre-ADMET, já havia destacado características farmacocinéticas adequadas de EPIT, como a não violação da regra de Lipinski, modelo de *druglikeness* utilizado pela farmacêutica Pfizer, que prediz moléculas promissoras para o desenvolvimento farmacêutico com boa biodisponibilidade para serem administradas por via oral (LIPINSKI *et al.*, 2001). Somando tais achados, EPIT se mostrou um alcaloide promissor para emprego na área da saúde, com

enfoque em doenças que acometem o SNC.

A necessidade de se determinar os potenciais efeitos citotóxicos de substâncias com possível aplicabilidade terapêutica em doenças que afetam o SNC é de suma importância para se compreender os riscos que elas podem trazer, visto que uma gama de enfermidades possuem caráter crônico e, em muitos dos casos, necessitam de intervenções medicamentosas a longo prazo, o que aumenta a probabilidade de efeitos tóxicos (CASCIONE *et al.*, 2020). Sendo assim, a avaliação da citotoxicidade de compostos constitui umas das etapas iniciais do desenvolvimento de novos fármacos (HALKS-MILLER; FEDOR; TYSON, 1991). No presente estudo, as avaliações da citotoxicidade da EPIT foram realizadas através da atividade da enzima LDH e do teste do MTT em células micróglia (linhagem BV2). Tais células assumem o papel de representação da imunidade inata no SNC e desempenham um papel chave na resposta inflamatória, bem como na resposta tóxica clássica, vista principalmente em situações de danos induzidos por neurotóxicos como o clorpirifos (organofosforado), a rotenona (inseticida) e as micotoxinas (GAO *et al.*, 2013; HENN *et al.*, 2009; LUND *et al.*, 2006; PEI *et al.*, 2021; STREIT, 2001; ZHANG *et al.*, 2019a).

A adição de concentrações crescentes de EPIT não foi capaz de aumentar significativamente a atividade da enzima LDH no sobrenadante de células BV2, bem como não reduziu a viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT. Em conjunto, os resultados obtidos no estudo da citotoxicidade de EPIT sugerem que essa molécula não interfere na integridade da membrana plasmática e não altera o metabolismo mitocondrial de células microgliais na faixa de concentração estudada.

Os dados apresentados no presente trabalho corroboram com o estudo anterior realizado pelo nosso laboratório (ROCHA *et al.*, 2019), onde EPIT não alterou a atividade da enzima LDH, nem interferiu no metabolismo mitocondrial de neutrófilos humanos. Em outro trabalho, desenvolvido por Veras e colaboradores (2012), EPIT também não alterou a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos e de células Vero (células renais de macaco verde africano) até a concentração de 1750  $\mu\text{M}$  no teste do MTT. É interessante destacar também que uma série de outros estudos envolvendo alcaloides como a triptantrina (KWON *et al.*, 2017), ajmalina (SI *et al.*, 2021), viridicatol (KO *et al.*, 2015) em células da linhagem BV2, apontam um comportamento citotóxico dessas substâncias em uma faixa de concentração menor (50, 100 e 160  $\mu\text{M}$ , respectivamente) do que a faixa de concentração investigada para a EPIT no presente estudo (3,5 - 350  $\mu\text{M}$ ). Esse cenário sugere que a EPIT possui uma margem de segurança preliminar de interesse para futuras aplicações terapêuticas.

O óxido nítrico (NO) consiste em um mediador versátil com diversos papéis

homeostáticos, principalmente no sistema cardiovascular e sistema nervoso central, além de importantes funções em processos patológicos, especificamente no contexto da inflamação (LIY *et al.*, 2021; YUSTE *et al.*, 2015). Sua produção no sistema nervoso central, advém de três isoformas da óxido nítrico sintetase (NOS), enzima responsável pela conversão da L-arginina a L-citrulina e ao NO propriamente dito. Nesse sentido, as isoformas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) são constitutivas, e expressas principalmente em neurônios da medula espinhal/vasos do cérebro e no sistema circulatório que circunda neurônios motores, respectivamente. Em contraste, a isoforma induzível (iNOS), presente nos astrócitos e na micróglia, tem sua expressão durante o estado de neuroinflamação (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Dessa forma, ao longo do processo inflamatório no SNC, estudos apontam que o NO produzido contribui para a morte neuronal, via disfunção mitocondrial, danos ao DNA e liberação de glutamato, com consequente morte celular excitotóxica (BAL-PRICE; BROWN, 2001; CALABRESE *et al.*, 2007; CHABRIER; DEMERLÉ-PALLARDY; AUGUET, 1999; LIPTON, 2007; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Por tais motivos, substâncias que possam diminuir a produção deste mediador, agindo sobre a expressão da iNOS, podem ser úteis no manejo de patologias que estejam associadas à neuroinflamação e à neurodegeneração (FREIRE *et al.*, 2009; KUBOYAMA *et al.*, 2011).

O alcaloide imidazólico EPIT mostrou-se capaz de reduzir parcialmente a produção de nitrito, que mensura indiretamente a produção de NO. Tal efeito foi reproduzido em nível de expressão proteica por meio da redução parcial da expressão da iNOS em células microgliais estimulada por LPS. Tais resultados são corroborados com estudo anterior (RODRIGUES DE CARVALHO *et al.*, 2018) onde EPIT reduziu a produção de nitrito e a expressão da iNOS, nos segmentos intestinais de ratos afetados pela doença de Crohn experimental induzida pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e de forma mais recente, com Rocha (2021) que demonstrou a capacidade de EPIT em inibir a expressão da iNOS na pata de camundongos submetidos a modelos de dor inflamatória persistente. Aliado a tais resultados, um estudo anterior realizado no nosso laboratório (ROCHA *et al.*, 2019) comprovou a habilidade da EPIT em reduzir o *burst* oxidativo de neutrófilos humanos ativados por PMA, processo que consiste na produção de uma gama de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) e o peroxinitrito. Apesar desses modelos não serem direcionados a doenças que atingem o SNC, esses estudos destacam a bioatividade de EPIT como antioxidante/anti-inflamatório e corroboram os achados do presente estudo, os quais indicam um reconhecimento inédito do potencial de EPIT em agir sobre a micróglia, representante imune predominante no SNC, constituindo cerca de 80% das células imunes do parênquima

cerebral (KORIN *et al.*, 2017; MORIMOTO; NAKAJIMA, 2019).

Associado ao exposto, diversos estudos também destacam a capacidade de alcaloides em reduzir a produção de nitrito e a expressão da iNOS em células micróglias linhagem da BV2 como a palmatina (concentração inibitória: 20  $\mu$ M), epiberberina (concentração inibitória: 20  $\mu$ M), coptisina (concentração inibitória: 20  $\mu$ M) isolados de *Coptis japonica* (JEON *et al.*, 2009), a cefarantina (concentração inibitória: 3  $\mu$ M) obtida a partir da espécie *Stephania cepharantha* Hayata (CHEN *et al.*, 2019), além da liensinina (concentração inibitória: 10  $\mu$ M), neferina (concentração inibitória: 10  $\mu$ M) e isoliensinina (concentração inibitória: 10  $\mu$ M) extraídas da *Nelumbo nucifera* (lotus) (MENG *et al.*, 2017), colocando tal classe de substâncias em forte evidência como fonte de potenciais fitofármacos anti-inflamatórios.

A produção de mediadores pró-inflamatórios (NO, IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) por células micróglias classicamente ativadas (perfil M1) é um processo comum na neuroinflamação e na neurodegeneração, estados que fazem parte da fisiopatologia de diversas doenças que atingem o sistema nervoso central (MUZIO; VIOTTI; MARTINO, 2021). Estudos destacam que o TNF- $\alpha$  leva à reativação microglial através de um *feedback* positivo, e contribui para o dano neuronal visto em desordens neurológicas (BRÁS *et al.*, 2020; KUNO *et al.*, 2005). De forma similar a IL-1 $\beta$  gera a ativação de cascata pró-inflamatórias ao estimular vias de sinalização intracelulares (MAPKs, NF- $\kappa$ B e iNOS) promovendo a propagação do estado neuroinflamatório (BURM *et al.*, 2015; DAI *et al.*, 2015; YUN-JUNG KIM *et al.*, 2006). A IL-6 por sua vez, tem um papel fundamental na perpetuação da ativação microglial (RECASENS *et al.*, 2021), onde trabalhos apontam que seus níveis aumentados também contribuem para a progressão de desordens neurodegenerativas como a doença de Parkinson (MOGI *et al.*, 1994; SAWADA; IMAMURA; NAGATSU, 2006). O estabelecimento crônico desse perfil inflamatório (M1), dificulta a retomada de um perfil microglial neuroreparador (M2), responsável por restaurar a homeostase no parênquima cerebral através da produção de mediadores anti-inflamatórios (FRANCO; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, 2015).

A EPIT mostrou-se capaz de agir sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, restabelecendo o nível de IL-1 $\beta$  ao encontrado em células não estimuladas pelo LPS, contribuindo na diminuição da liberação de TNF- $\alpha$  e reduzindo de forma expressiva a produção de IL-6. Tais dados corroboram com trabalhos onde EPIT foi capaz de diminuir a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  em neutrófilos humanos (ROCHA *et al.*, 2019), bem como reduzir a concentração de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na cavidade peritoneal de camundongos submetidos ao modelo de peritonite induzido por carragenina (SILVA *et al.*, 2013) e restabelecer a concentração de IL-1 $\beta$  aos níveis

basais no intestino de em ratos submetidos a doença de Crohn induzida por TNBS (CARVALHO *et al.*, 2018). Com isso, tais dados ratificam o potencial anti-inflamatório desse alcaloide que além de agir sobre o eixo inflamatório iNOS/NO também se mostra hábil em exercer efeito sobre a produção de outros mediadores inflamatórios associados a diversas patologias, incluindo o estado neuroinflamatório encontrado em doenças neurodegenerativas.

Uma série de estudos destacam a interface entre o sistema nervoso e o sistema imune através de circuitos neurais que possuem como função o controle da inflamação (MINA-OSORIO *et al.*, 2012; PAVLOV; TRACEY, 2017; UENO *et al.*, 2016). A produção de mediadores anti-inflamatórios como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13 e IL-10 pela micróglia (perfil M2), durante o desequilíbrio homeostático é um passo importante para a resolução da inflamação e reparo tecidual (FRANCESCHI *et al.*, 2007; PRINZ; PRILLER, 2014; SOCHOCKA; DINIZ; LESZEK, 2017). Em particular, a IL-10 é uma importante moduladora da ativação microglial, pois mantém o balanço entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios no SNC, contribuindo também para a sobrevivência celular através da promoção na expressão de fatores anti-apoptóticos (LAFFER *et al.*, 2019; MOORE *et al.*, 2001). A adição da EPIT não se mostrou capaz de estimular a produção de IL-10 em células microgliais expostas ao LPS. Sugerindo, que esse alcaloide parecer atuar inibindo mecanismos pró-inflamatórios, sem interferir em mecanismos anti-inflamatórios.

É importante registrar que o resultado obtido no presente estudo diferiu de um estudo desenvolvido em nosso laboratório (ROCHA, 2021), no qual a administração oral de EPIT (1 mg/kg) estimulou a produção de IL-10 no tecido subplantar de animais submetidos ao modelo de dor inflamatória induzido por carragenina. Tal divergência pode ser explicada pela natureza distinta dos modelos experimentais, mas também por estudos (FLEISHER-BERKOVICH *et al.*, 2010; JOSEPH; JOSÉ LUIS VENERO, 2013; SARKAR *et al.*, 2018) que têm destacado um caráter predominantemente pró-inflamatório vindo de células microgliais da linhagem BV2. Foi demonstrado que células BV2 apresentam altos níveis basais de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e mediadores (NO) pró-inflamatórias quando comparadas com outras linhagens celulares (cultura primária murina e linhagem MMC) (SARKAR *et al.*, 2018). Além do exposto, células BV2 quando ativadas pelo LPS expressariam em maiores quantidades mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparados a mediadores anti-inflamatórios (JOSEPH; JOSÉ LUIS VENERO, 2013), o que tornaria o microambiente proposto no presente estudo, extremamente pró-inflamatório, dificultando uma possível polarização microglial para um perfil anti-inflamatório (M2) por agentes candidatos a fármacos. Ressalta-se que essa hipótese deve ser confirmada em estudos futuros, com o emprego de novas

abordagens como a avaliação de outros mediadores e avaliação em modelos experimentais *in vivo*, visto relatos na literatura que destaca a capacidade de moléculas de origem natural, como os compostos polifenólicos rutina e curcumina em exercerem seus efeitos anti-inflamatórios, em parte devido a capacidade de polarizarem as células da linhagem BV2 para o perfil M2 (GUANG-PING LANG; CAN LI; YING-YING HAN, 2021; ZHANG *et al.*, 2019b).

Os receptores do tipo *toll like* são expressos em mamíferos e codificados por uma linha germinativa que leva a sua manifestação em células do sistema imune inato (LU; YEH; OHASHI, 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). De forma sucinta, sua interação com PAMPs e moléculas endógenas leva a expressão de citocinas pró-inflamatórias como produto final, além de contribuir no processo de apresentação de antígenos (LEE; IWASAKI, 2007). Estudos recentes destacam que a ativação do TLR4 em células microgлияis está estritamente envolvido com a ativação da via do NF- $\kappa$ B e das MAPKs (AP-1), produção de citocinas (IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e, conseqüentemente, com a neurotoxicidade mediada pela micrógлия em diversas doenças que acometem o SNC (AZAM *et al.*, 2019; BUCHANAN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2021b; TENG *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2007). O pré-tratamento da micrógлия com EPIT reduziu a expressão do TLR4 induzida pelo LPS. De forma similar, estudos destacam a capacidade de outros alcaloides em diminuir a ativação desse receptor em células BV2, como a nicotina (concentração inibitória: 1,6 mM) presente no tabaco (produto obtido da folha de plantas do gene *Nitociana*) (LI *et al.*, 2021a) e a oximatrina (concentração inibitória: 20  $\mu$ g/mL) extraída da espécie *Sophora flavescens* (DING *et al.*, 2016).

Prosseguindo os estudos, investigamos se EPIT teria alguma influência sobre a expressão proteica do TREM2. Estudos *in vitro* destacam que esse receptor transmembrana, formado por um único domínio da superfamília de imunoglobulinas, está envolvido com a polarização para um perfil anti-inflamatório, através da estimulação na produção de IL-4 e do fator de transcrição STAT6, relacionado a um aumento na produção de genes ligados a geração de arginase-1 (*Arg-1*), um importante marcador anti-inflamatório, que age reduzindo os níveis de NO gerados durante a ativação microgлияl (LIU *et al.*, 2020). Nas condições avaliadas, EPIT não se mostrou capaz de reverter a inibição da expressão do TREM2 ocasionada pelo estímulo inflamatório do LPS, que ao ativar o TLR4 causa uma redução da expressão desse receptor (OWENS *et al.*, 2017; SCHMID *et al.*, 2002; TURNBULL *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2019). Dessa forma, constatamos que o alcaloide EPIT possui propriedades farmacológicas capazes de atenuar a resposta inflamatória em células microgлияis da linhagem BV2 estimuladas por LPS, porém não apresenta efeitos imunomoduladores sobre os marcadores de polarização M2 (IL-10 e TREM2) investigados nesse estudo.

Buscando desvendar mais um provável mecanismo de ação anti-inflamatório da EPIT sobre vias de sinalização intracelulares, foi investigado o efeito dessa molécula sobre o NF- $\kappa$ B e a via das MAPKs (JNK e ERK 1/2). O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é responsável por regular diversos processos da resposta imune inata e adaptativa, agindo como um intermediador da inflamação, devido sua capacidade em induzir a produção de genes pró-inflamatórios (LIU *et al.*, 2017). Prototipicamente, consiste em uma proteína dimérica, que inclui as subunidades p50 e p65 ligadas ao inibidor Cinase I $\kappa$ B (complexo IKK) no citoplasma da célula. Após sua estimulação por citocinas ou PRRs, como o TLR4, seu inibidor (I $\kappa$ B) é fosforilado e degradado via proteassoma, deixando livre o dímero (p50 e p65) para translocação com destino ao núcleo da célula, onde assim pode iniciar o processo de transcrição de genes pró-inflamatórios, através da ligação da subunidade p65 com sequências alvo de DNA, visto que a subunidade p50 não possui atividade transcricional (ALBENSI, 2019; CHEN; GREENE, 2004; DORRINGTON; FRASER, 2019; SEN; SMALE, 2010).

Constatamos no presente estudo, que EPIT inibiu parcialmente o processo de fosforilação da subunidade p65 em células microgliais estimuladas com LPS. Esse resultado corrobora com estudo anterior (ROCHA *et al.*, 2019) desenvolvido no nosso laboratório, onde esse alcaloide também se mostrou capaz de inibir a migração da subunidade p65 para o núcleo de neutrófilos humanos estimulados por fMLP, potente agente quimiotático de leucócitos, mostrando dessa forma a capacidade dessa molécula em agir sobre a via em questão, em células imunes inatas centrais e periféricas, respectivamente. Com isso, podemos atribuir que a capacidade dessa molécula em inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios (NO, IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e proteínas induzidas durante a inflamação (iNOS) em células microgliais, parece estar relacionada em parte, a sua capacidade em agir sobre o fator de transcrição NF- $\kappa$ B.

A via das MAPKs (ERK1/2, p38 e JNK) assim como o NF- $\kappa$ B também está intimamente ligada à regulação de diversos processos celulares, dentre eles a resposta inflamatória (MOENS; KOSTENKO; SVEINBJØRNSSON, 2013). Por tais motivos, após o contato com estímulos inflamatórios primários como citocinas e produtos microbianos como o LPS (agindo via TLR4), as proteínas pertencentes a essa família sofrem processos de fosforilação e ativam fatores de transcrição presentes no citoplasma (NF- $\kappa$ B e AP-1) e no núcleo, contribuindo dessa forma para a produção de mediadores inflamatórios (FENG; LI, 2011; JAYAKUMAR *et al.*, 2022; KYRIAKIS; AVRUCH, 2012; PEARSON *et al.*, 2001), situação presente durante a ativação de células microgliais em doenças que atingem o SNC (HARPER; WILKIE, 2003; KIM; CHOI, 2010).

De forma inédita demonstramos a capacidade de EPIT em inibir o processo de

fosforilação das MAPKs ao demonstrar ação sobre ERK1/2 e JNK, constatando que o efeito anti-inflamatório dessa molécula também está associado à inibição da via em questão. Nenhum outro estudo anterior havia proposto esse mecanismo de ação molecular para esse alcaloide. Porém, diversos trabalhos na literatura já destacam a capacidade de alcaloides em inibir essa via de sinalização intracelular em células BV2, como a protopina (concentração inibitória: 5 – 20  $\mu\text{M}$ ) obtida de *Corydalis yanhusuo* (ALAM *et al.*, 2019) e a Isotalatizidina (concentração inibitória: 25  $\mu\text{M}$ ) proveniente da espécie *Aconitum carmichaelii* Debx (SHAO *et al.*, 2020), ambas presentes na medicina chinesa. Colocando assim, tal classe em forte evidência como potenciais inibidores do processo inflamatório desencadeado pelas MAPKs.

Os resultados obtidos demonstram que a via TLR4-NF- $\kappa$ B/MAPKs possui papel importante no efeito anti-inflamatório do alcaloide imidazólico EPIT em células microgлияis, um efeito expresso pela redução significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), além da redução de óxido nítrico/nitrito, est ratificada pela redução na expressão de iNOS.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho com o alcaloide imidazólico epiisopiloturina (EPIT) de *P. mycophyllus* demonstraram que:

- EPIT possui alta probabilidade em ultrapassar a BHE determinada através de estudo de predição farmacocinética;
- O pré-tratamento de células micróglias com esse alcaloide foi capaz de reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios (NO, IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), mas não se mostrou hábil em estimular a produção de mediadores anti-inflamatórios (IL-10), e esses efeitos não estão associados a uma citotoxicidade;
- O efeito anti-inflamatório apresentado por EPIT está relacionado a um mecanismo de ação molecular dependente da via TLR4-MAPKs/NF- $\kappa$ B-iNOS.

O presente estudo, mostrou de maneira inédita, o efeito anti-inflamatório promissor do alcaloide epiisopiloturina em células imunes do SNC, através de sua ação sobre a micróglia (linhagem BV2) em estado inflamatório induzido pelo LPS. Ademais, a investigação das propriedades anti-inflamatórias dessa molécula deve ser aprofundada, através da verticalização de estudos que busquem entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos no seu feito farmacológico em outras células do SNC, como os astrócitos e neurônios. O potencial de EPIT em modelos *in vivo* que envolvam neuroinflamação e neurodegeneração também deve ser imprescindivelmente estudado. Uma melhor investigação de suas propriedades imunomoduladoras também deve ser realizada através da análise de novos parâmetros em estudos *in vitro* aliado a modelos de experimentação animal, agregando dessa forma, mais evidências a esse produto regional com enorme potencial e aplicabilidade para a saúde no campo das doenças que acometem o sistema nervoso central.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. *et al.* Peripheral Blood Neutrophil Activation Patterns Are Associated with Pulmonary Inflammatory Responses to Lipopolysaccharide in Humans. **J Immunol** **2006**; v. 176, p. 7753–7760, 2015.
- ALAM, M. B. *et al.* Protopine attenuates inflammation stimulated by carrageenan and LPS via the MAPK/NF- $\kappa$ B pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, n. April, p. 110583, 2019.
- ALBENSI, B. C. What is nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) doing in and to the mitochondrion? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, n. JULY, p. 1–7, 2019.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.
- ALVES DE ALMEIDA, A. C. *et al.* Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis: Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- ANDRADE-NETO, M. *et al.* 24-methyl-25-ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 3, p. 739–743, 1994.
- AZAM, S. *et al.* Regulation of toll-like receptor (TLR) signaling pathway by polyphenols in the treatment of age-linked neurodegenerative diseases: Focus on TLR4 signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, 2019.
- BACHILLER, S. *et al.* Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. December, p. 1–17, 2018.
- BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6480–6491, 2001.
- BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 49–59, 2017.

- BENTO, R. *et al.* Comparative Vibrational Spectra of Pilosine and Epiisopilosine crystals. **Brazilian Journal of Physics**, v. 40, n. 2, p. 217–223, 2010.
- BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57–69, 2007.
- BOSURGI, L. *et al.* Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. **Science**, v. 356, n. 6342, p. 1072–1076, 2017.
- BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 4991–4995, 2000.
- BRÁS, J. P. *et al.* TNF-alpha-induced microglia activation requires miR-342: impact on NF-kB signaling and neurotoxicity. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 6, 2020.
- BRITES, D.; FERNANDES, A. Neuroinflammation and depression: Microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. DEC, p. 1–20, 2015.
- BUCHANAN, M. M. *et al.* Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 1, p. 13–27, 2010.
- BURM, S. M. *et al.* Inflammasome-induced IL-1 $\beta$  secretion in microglia is characterized by delayed kinetics and is only partially dependent on inflammatory caspases. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 2, p. 678–687, 2015.
- CALABRESE, V. *et al.* Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 766–775, 2007.
- CASCIONE, M. *et al.* The New Frontiers in Neurodegenerative Diseases Treatment : Liposomal-Based Strategies. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. October, 2020.
- CHABRIER, P. E.; DEMERLÉ-PALLARDY, C.; AUGUET, M. Nitric oxide synthases: Targets for therapeutic strategies in neurological diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, n. 8–9, p. 1029–1035, 1999.

CHANG, N. C. A. *et al.* A Macrophage Protein, Ym1, Transiently Expressed during Inflammation Is a Novel Mammalian Lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17497–17506, 2001.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.

CHEN, L. F.; GREENE, W. C. Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 5, p. 392–401, 2004.

CHEN, M. L. *et al.* Cepharanthine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation. **Pharmazie**, v. 74, n. 10, p. 606–610, 2019.

CHEN, W. W.; ZHANG, X.; HUANG, W. J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 4, p. 3391–3396, 2016.

CHEN, Z. *et al.* Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 34, p. 11706–11715, 2012.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 1–15, 2014.

COSTIGAN, M. *et al.* T-cell infiltration and signaling in the adult dorsal spinal cord is a major contributor to neuropathic pain-like hypersensitivity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 46, p. 14415–14422, 2009.

CUNNINGHAM, C. L.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V.; NOCTOR, S. C. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 10, p. 4216–4233, 2013.

DAI, W. L. *et al.* Levo - Corydalmine attenuates microglia activation and neuropathic pain by suppressing ASK1-p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways in rat spinal cord. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 45, n. 3, p. 219–229, 2020.

DAI, X. *et al.* Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway. **Cell Stress**

**and Chaperones**, v. 20, p. 321–331, 2015.

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, p. 1117–1121, 2016.

DAMON DISABATO; NING QUAN; JONATHAN P. GODBOUT. The Devil Is in the Details. **J Neurochem.**, v. 139, n. 2, p. 136–153, 2016.

DE SMEDT-PEYRUSSE, V. *et al.* Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 2, p. 296–307, 2008.

DEY, P. *et al.* **Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids)**. [s.l.: s.n.]. v. 4

DING, F. *et al.* Oxymatrine inhibits microglia activation via HSP60-TLR4 signaling. **Biomedical Reports**, v. 5, n. 5, p. 623–628, 2016.

DORRINGTON, M. G.; FRASER, I. D. C. NF- $\kappa$ B signaling in macrophages: Dynamics, crosstalk, and signal integration. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, 2019.

DUNN, A. J. *et al.* Reduced ingestion of sweetened milk induced by interleukin-1 and lipopolysaccharide is associated with induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelia. **NeuroImmunoModulation**, v. 13, n. 2, p. 96–104, 2006.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21–35, 2014.

FALCÃO, H. D. S. *et al.* Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: A review. **Molecules**, v. 13, n. 12, p. 3198–3223, 2008.

FATOBA, O.; ITOKAZU, T.; YAMASHITA, T. Microglia as therapeutic target in central nervous system disorders. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 144, n. 3, p. 102–118, 2020.

FENG, X. *et al.* B-Arrestin Protects Neurons By Mediating Endogenous Opioid Arrest of Inflammatory Microglia. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 3, p. 397–406, 2014.

FENG, Y. J.; LI, Y. Y. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Journal of Digestive Diseases**, v. 12, n. 5, p. 327–332, 2011.

FLEISHER-BERKOVICH, S. *et al.* Distinct modulation of microglial amyloid  $\beta$  phagocytosis and migration by neuropeptides. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 61, p. 1–13, 2010.

FOSS, J. D. *et al.* Mitragynine, bioactive alkaloid of kratom, reduces chemotherapy-induced neuropathic pain in rats through  $\alpha$ -adrenoceptor mechanism. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 209, n. December 2019, p. 10–13, 2020.

FRANCESCHI, C. *et al.* Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, n. 1, p. 92–105, 2007.

FRANCO, R.; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 131, p. 65–86, 2015.

FREIRE, M. A. M. *et al.* Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. **Frontiers in Neuroscience**, v. 3, n. SEP, p. 175–181, 2009.

GAO, F. *et al.* Rotenone Directly Induces BV2 Cell Activation via the p38 MAPK Pathway. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–9, 2013.

GILHUS, N. E.; DEUSCHL, G. Neuroinflammation — a common thread in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 8, p. 429–430, 2019.

GINHOUX, F. *et al.* Origin and differentiation of microglia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. MAR, p. 1–14, 2013.

GIULIAN, D. Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. **American Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 1, p. 13–18, 1999.

GOLDMANN, T. *et al.* A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 1618–1626, 2013.

GORECKI, A. M.; ANYAEGBU, C. C.; ANDERTON, R. S. TLR2 and TLR4 in Parkinson's

disease pathogenesis: the environment takes a toll on the gut. **Translational Neurodegeneration**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2021.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of Nitrate , Nitrite , and [ <sup>15</sup>N ] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 138, 1982.

GUANG-PING LANG; CAN LI; YING-YING HAN. Rutin pretreatment promotes microglial M1 to M2 phenotype polarization. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 201915, p. 2499–2504, 2021.

GUERRERO, B. L.; SICOTTE, N. L. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. March, p. 1–8, 2020.

GUIMARÃES, M. A. *et al.* Epiisopilosine alkaloid has activity against schistosoma mansoni in mice without acute toxicity. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–19, 2018.

GUZMAN-MARTINEZ, L. *et al.* Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. SEP, p. 1–17, 2019.

HALKS-MILLER, M.; FEDOR, V.; TYSON, C. A. Overview of Approaches to In Vitro Neurotoxicity Testing. **International Journal of Toxicology**, v. 10, n. 6, p. 727–736, 1991.

HANN, M. M.; SIMPSON, G. L. Intracellular drug concentration and disposition - The missing link? **Methods**, v. 68, n. 2, p. 283–285, 2014.

HANNEMANN, N. *et al.* The AP-1 Transcription Factor c-Jun Promotes Arthritis by Regulating Cyclooxygenase-2 and Arginase-1 Expression in Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 9, p. 3605–3614, 2017.

HARPER, S. J.; WILKIE, N. MAPKs: new targets for neurodegeneration. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 7, n. 2, p. 187–200, 2003.

HENDRICKSON, R. G.; MOROCCO, A. P.; MICHAEL I. GREENBERG. Pilocarpine toxicity and the treatment of xerostomia. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 26, n. 4, p. 429–432, 2004.

HENN, A. *et al.* The Suitability of BV2 Cells as Alternative Model System for Primary Microglia Cultures or for Animal Experiments Examining Brain Inflammation. **Altex**, v. 26,

n. 1, p. 83–94, 2009.

HEPPNER, F. L.; RANSOHOFF, R. M.; BECHER, B. Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 358–372, 2015.

HERZOG, C. *et al.* Rapid clearance of cellular debris by microglia limits secondary neuronal cell death after brain injury in vivo. **Development (Cambridge)**, v. 146, n. 9, 2019.

INES MARIA CORRALIZA, GERMAN SOLER, K. E. AND M. M. Arginase Induction By Suppressors of Nitric Oxide Synthesis (IL-4, IL-10, PGE2) in Murine Bone-Marrow-derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Reserach Communications**, v. 206, p. 667–673, 1995.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 138–152, 2018.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 987–995, 2004.

JANABI, N. *et al.* Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. **Neuroscience Letters**, v. 195, n. 2, p. 105–108, 1995.

JAYAKUMAR, T. *et al.* Targeting MAPK / NF- $\kappa$  B Pathways in Anti-Inflammatory Potential of Rutaecarpine : Impact on Src / FAK-Mediated Macrophage Migration. p. 1–15, 2022.

JEON, S. J. *et al.* Inhibitory effects of Coptis japonica alkaloids on the LPS-induced activation of BV2 microglial cells. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 17, n. 1, p. 70–78, 2009.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? **Pain**, v. 154, n. SUPPL. 1, p. S10–S28, 2013.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 533–548, 2014.

JIN, G. L. *et al.* Koumine attenuates neuroglia activation and inflammatory response to

neuropathic pain. **Neural Plasticity**, v. 2018, 2018.

JOSEPH, B.; JOSÉ LUIS VENERO. **Microglia: Methods and Protocols**. New York: Springer Science+Business Media New, 2013.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637–650, 2011.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396–405, 2010.

KO, W. M. *et al.* Viridicatol from marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5295 exerts anti-inflammatory effects through inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway on Lipopolysaccharide-induced RAW264.7 and BV2 cells. **Natural Product Sciences**, v. 21, n. 4, p. 240–247, 2015.

KORIN, B. *et al.* Resource High-dimensional , single-cell characterization of the brain's immune compartment. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 9, p. 1300–1310, 2017.

KUAI, C. P. *et al.* Corydalis saxicola Alkaloids Attenuate Cisplatin-Induced Neuropathic Pain by Reducing Loss of IENF and Blocking TRPV1 Activation. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 48, n. 2, p. 407–428, 2020.

KUBOYAMA, K. *et al.* Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1–11, 2011.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 465–468, 2018.

KUNO, R. *et al.* Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Journal of Neuroimmunology**, v. 162, n. 1–2, p. 89–96, 2005.

KWON, H. S.; KOH, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2020.

KWON, Y. W. *et al.* Tryptanthrin suppresses the activation of the LPS-treated BV2 microglial cell line via Nrf2/HO-1 antioxidant signaling. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n.

February, p. 1–12, 2017.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 689–737, 2012.

LAFFER, B. *et al.* Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. October, p. 1–12, 2019.

LAWSON, L. J. *et al.* Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1990.

LEE, H. K.; IWASAKI, A. Innate control of adaptive immunity: Dendritic cells and beyond. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 48–55, 2007.

LEITNER, G. R. *et al.* Targeting toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 23, n. 10, p. 865–882, 2019.

LI, H. *et al.* Nicotine and its metabolite cotinine target MD2 and inhibit TLR4 signaling. **The Innovation**, v. 2, n. 2, p. 100111, 2021a.

LI, Q.; BARRES, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 4, p. 225–242, 2018.

LI, X. *et al.* Oleanolic acid administration alleviates neuropathic pain after a peripheral nerve injury by regulating microglia polarization-mediated neuroinflammation. **RSC Advances**, v. 10, n. 22, p. 12920–12928, 2020.

LI, Y. *et al.* Targeting Microglial  $\alpha$ -Synuclein/TLRs/NF-kappaB/NLRP3 Inflammasome Axis in Parkinson's Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. October, p. 1–16, 2021b.

LIAUNARDY-JOPEACE, A.; GAY, N. J. Molecular and cellular regulation of Toll-like receptor-4 activity induced by lipopolysaccharide ligands. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–5, 2014.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery**

**Reviews**, v. 64, p. 3–26, 2001.

LIPTON, S. Pathologically-Activated Therapeutics for Neuroprotection: Mechanism of NMDA Receptor Block by Memantine and S-Nitrosylation. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 5, p. 621–632, 2007.

LIU, T. *et al.* NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. March, 2017.

LIU, W. *et al.* Trem2 promotes anti-inflammatory responses in microglia and is suppressed under pro-inflammatory conditions. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 19, p. 3224–3248, 2020.

LIY, P. M. *et al.* Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, n. 22, p. 2399–2406, 2021.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008.

LUND, S. *et al.* The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. **Journal of Neuroimmunology**, v. 180, n. 1–2, p. 71–87, 2006.

MAEHLE, A.-H. *et al.* The emergence of the drug receptor theory. **Nature Reviews | Drug Discovery**, v. 1, n. August, p. 337–341, 2002.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**, v. 33, n. 1, p. 131–139, 2019.

MENG, X. L. *et al.* Inhibitory effects of three bisbenzylisoquinoline alkaloids on lipopolysaccharide-induced microglial activation. **RSC Advances**, v. 7, n. 30, p. 18347–18357, 2017.

MINA-OSORIO, P. *et al.* Neural signaling in the spleen controls B-cell responses to blood-borne antigen. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 18, p. 618–627, 2012.

MIURA, L. M. C. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana,**

**antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal).** [s.l.] Universidade Federal do Piauí, 2009.

MOENS, U.; KOSTENKO, S.; SVEINBJØRNSSON, B. The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases (MAPKAPKs) in inflammation. **Genes**, v. 4, n. 2, p. 101–133, 2013.

MOGI, M. *et al.* Interleukin-1beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neuroscience Letters**, v. 180, p. 147–150, 1994.

MONIER, A. *et al.* Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 66, n. 5, p. 372–382, 2007.

MOORE, K. W. *et al.* Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 1, n. 1, p. 683–765, 2001.

MORIMOTO, K.; NAKAJIMA, K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. September, p. 1–11, 2019.

MOSER, B.; WILLIMANN, K. Chemokines: Role in inflammation and immune surveillance. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. SUPPL. 2, p. 84–89, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUZIO, L.; VIOTTI, A.; MARTINO, G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, n. September, 2021.

NDLOVU, 'MATLADI N. *et al.* Hyperactivated NF- $\kappa$ B and AP-1 Transcription Factors Promote Highly Accessible Chromatin and Constitutive Transcription across the Interleukin-6 Gene Promoter in Metastatic Breast Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 20, p. 5488–5504, 2009.

NETEA, M. G. *et al.* A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p.

826–831, 2017.

NICOLAU, L. A. D. *et al.* Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 188–195, 2017.

NIRANJAN, R. Molecular basis of etiological implications in alzheimer's disease: Focus on neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 3, p. 412–428, 2013.

NOUREDDINE BRIBI. Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. **Asian Journal of Botany**, v. 1, p. 1–6, 2018.

O'CONNOR, S. E. Alkaloids. **Comprehensive Natural Products II**, v. 2, p. 977–1007, 2010.

O'NEILL, L. A. J.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 5, p. 353–364, 2007.

OH, W. J. *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by *Buddleja officinalis* extract in BV-2 microglial cells via negative regulation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9195–9206, 2013.

OLD, E. A. *et al.* Monocytes expressing CX3CR1 orchestrate the development of vincristine-induced pain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 2023–2036, 2014.

ORIHUELA, R.; MCPHERSON, C. A.; HARRY, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 4, p. 649–665, 2016.

OWENS, R. *et al.* Divergent neuroinflammatory regulation of microglial TREM expression and involvement of NF- $\kappa$ B. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. March, p. 1–14, 2017.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 156–166, 2017.

PEARSON, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153–183, 2001.

- PEI, X. *et al.* Food-Origin Mycotoxin-Induced Neurotoxicity: Intend to Break the Rules of Neuroglia Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.
- PÉREZ-CERDÁ, F.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; MATUTE, C. Pío del Río hortega and the discovery of the oligodendrocytes. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. July, p. 7–12, 2015.
- PERRY, V. H. Innate inflammation in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 9, p. 1–12, 2012.
- PIRANI, J.R. & GROPPPO, M. **Rutaceae**. Disponível em:  
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212>>. Acesso em: 26 mar. 2021.
- POLLOCK, T. B. *et al.* Transcriptome Analyses in BV2 Microglial Cells Following Treatment With Amino-Terminal Fragments of Apolipoprotein E. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, n. August, p. 1–15, 2020.
- POPIOLEK-BARCZYK, K. *et al.* Parthenolide relieves pain and promotes M2 microglia/macrophage polarization in rat model of neuropathy. **Neural Plasticity**, v. 2015, 2015.
- POPIOLEK-BARCZYK, K.; MIKA, J. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 2908–2928, 2016.
- PRILLER, J. *et al.* Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. **Nature Medicine**, v. 7, n. 12, p. 1356–1361, 2001.
- PRILLER, J.; PRINZ, M. Targeting microglia in brain disorders. **Science**, v. 364, n. 6448, p. 32–33, 2019.
- PRINZ, M.; PRILLER, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: From origin to neuropsychiatric disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 300–312, 2014.
- QIU, S. *et al.* Natural alkaloids: Basic aspects, biological roles, and future perspectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 6, p. 401–406, 2014.
- QUINTANS, J. S. S. *et al.* Natural products evaluated in neuropathic pain models - a systematic review. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 6, p. 442–

450, 2014.

RANSOHOFF, R. M.; EL KHOURY, J. Microglia in health and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2016.

RECASENS, M. *et al.* Chronic exposure to IL-6 induces a desensitized phenotype of the microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 1–22, 2021.

ROCHA, T. M. **Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de alcaloides imidazólicos de *Pilocarpus microphyllus*: estudo *in vitro*, *in vivo* e *in silico***. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

ROCHA, T. M. **Formulação farmacêutica à base de epiisopiloturina, alcaloide de *Pilocarpus microphyllus*, reduz a hipernocicepção inflamatória: papel da via NO/GMPc/PKG/K+ATP e modulação da resposta imune**. 2021. 19 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

ROCHA, J. A. *et al.* Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–23, 2018.

ROCHA, T. M. *et al.* Imidazole alkaloids inhibit the pro-inflammatory mechanisms of human neutrophil and exhibit anti-inflammatory properties in vivo. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 5, p. 849–859, 2019.

RODRIGUES DE CARVALHO, L. *et al.* Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, n. March, p. 278–285, 2018.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, J. A. *et al.* Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1–46, 2020.

ROJEWSKA, E. *et al.* Involvement of pro- and antinociceptive factors in minocycline analgesia in rat neuropathic pain model. **Journal of Neuroimmunology**, v. 277, n. 1–2, p. 57–66, 2014.

SAEKI, N.; IMAI, Y. Reprogramming of synovial macrophage metabolism by synovial fibroblasts under inflammatory conditions. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2020.

SANTOS, A. P.; ROBERTO, P.; MORENO, H. Pilocarpus spp. : A survey of its chemical constituents and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 115–137, 2004.

SARKAR, S. *et al.* Characterization and comparative analysis of a new mouse microglial cell model for studying neuroinflammatory mechanisms during neurotoxic insults. **NeuroToxicology**, v. 67, p. 129–140, 2018.

SAWADA, M.; IMAMURA, K.; NAGATSU, T. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission, Supplement**, n. 70, p. 373–381, 2006.

SCHMID, C. D. *et al.* Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 6, p. 1309–1320, 2002.

SEN, R.; SMALE, S. T. Selectivity of the NF- $\kappa$ B response. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 4, p. 1–15, 2010.

SHAO, S. *et al.* Isotalatizidine, a C19-diterpenoid alkaloid, attenuates chronic neuropathic pain through stimulating ERK/CREB signaling pathway-mediated microglial dynorphin A expression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2020.

SHIH, R. H.; WANG, C. Y.; YANG, C. M. NF- $\kappa$ B signaling pathways in neurological inflammation: A mini review. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. DEC, p. 1–8, 2015.

SI, Y.-Y. *et al.* Neuroinflammatory inhibitors from *Gardneria nutans* Siebold & Zuccarini. **RSC Advances**, v. 11, n. 44, p. 27085–27091, 2021.

SILVA, G. *et al.* Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. 2013.

SOCHOCKA, M.; DINIZ, B. S.; LESZEK, J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 8071–8089, 2017.

STONE, K. P.; KASTIN, A. J.; PAN, W. Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistry NFN N B is an Unexpected Major Mediator of Interleukin-15 Signaling in Cerebral Endothelia. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 70808, 2011.

STREIT, W. J. Microglia and macrophages in the developing CNS. **NeuroToxicology**, v. 22, n. 5, p. 619–624, 2001.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TENG, W. *et al.* Activation of TLR4-mediated NFκB signaling in hemorrhagic brain in rats. **Mediators of Inflammation**, v. 2009, 2009.

THEUNISSEN, M. *et al.* Local Oral Pilocarpine Drops for Relieving Xerostomia (Dry Mouth) in the Elderly: A Pilot Study. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 22, n. 1, p. 185–186, 2021.

TIMMERMAN, R.; BURM, S. M.; BAJRAMOVIC, J. J. An overview of in vitro methods to study microglia. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. August, p. 1–12, 2018.

TSAIOUN, K.; BLAAUBOER, B. J.; HARTUNG, T. Evidence-based absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and its interplay with alternative toxicity methods. **Altex**, v. 33, n. 4, p. 343–358, 2016.

TSUDA, M. *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, v. 424, n. 6950, p. 778–783, 2003.

TURNBULL, I. R. *et al.* Cutting Edge: TREM-2 Attenuates Macrophage Activation. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3520–3524, 2006.

UENO, M. *et al.* Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 543–551, 2013.

UENO, M. *et al.* Silencing spinal interneurons inhibits immune suppressive autonomic reflexes caused by spinal cord injury. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 784–787, 2016.

VENEGAS, C.; HENEKA, M. T. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 1, p. 87–98, 2017.

VERAS, L. M. *et al.* Activity of Epiisopiloturine Against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2051–2058, 2012.

WALTER, J. The triggering receptor expressed on myeloid cells 2: A Molecular link of neuroinflammation and neurodegenerative diseases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 9, p. 4334–4341, 2016.

WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. **Journal of Molecular Medicine**, v. 74, n. 10, p. 589–607, 1996.

WOO, M. *et al.* Selective modulation of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression and mitogen-activated protein kinase pathways by dibutyryl-cAMP in BV2 microglial cells. **Molecular Brain Research**, v. 113, p. 86–96, 2003.

XUE, F.; DU, H. TREM2 Mediates Microglial Anti-Inflammatory Activations in Alzheimer's Disease: Lessons Learned from Transcriptomics. p. 1–14, 2021.

YAKOVLEVA, T. *et al.* Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: A role of the NF- $\kappa$ B system. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. S29–S38, 2011.

YAMASAKI, R. *et al.* Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1533–1549, 2014.

YUN-JUNG KIM *et al.* IL-1 $\beta$ , an Immediate Early Protein Secreted by Activated Microglia, Induces iNOS/NO in C6 Astrocytoma Cells Through p38 MAPK and NF- $\kappa$ B Pathways. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, n. April, p. 3244–3253, 2006.

YUSTE, J. E. *et al.* Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. AUGUST, p. 1–13, 2015.

ZHANG, C. *et al.* Protective mechanism of Taxifolin for chlorpyrifos neurotoxicity in BV2 cells. **NeuroToxicology**, v. 74, n. May, p. 74–80, 2019a.

ZHANG, C.; YANG, M.; ERICSSON, A. C. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–12, 2021.

ZHANG, J. *et al.* Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2 / TLR4 / NF- $\kappa$ B pathways in BV2 cells. **Molecular Immunology**, v. 116, n. May, p. 29–37, 2019b.

ZHOU, J. *et al.* Imbalance of Microglial TLR4/TREM2 in LPS-Treated APP/PS1 Transgenic Mice: A Potential Link Between Alzheimer's Disease and Systemic Inflammation. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 5, p. 1138–1151, 2019.

ZHOU, M. LIANG *et al.* Expression of Toll-like receptor 4 in the basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits: A preliminary study. **Brain Research**, v. 1173, n. 1, p. 110–116, 2007.

ZHOU, Y. *et al.* TLR4 Targeting as a Promising Therapeutic Strategy for Alzheimer Disease Treatment. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. December, p. 1–9, 2020.

ZHOU, Y.; HONG, Y.; HUANG, H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. **Kidney Blood Press. Res.**, v. 41, n. 6, p. 901–910, 2016.

ZHU, C. *et al.* Effects of alkaloids on peripheral neuropathic pain: A review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 15, n. 1, p. 1–24, 2020.