



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Bárbara Casella Amorim

**Potencial imunomodulador de substâncias bioativas
vegetais na ativação do inflamassoma no contexto
da paracoccidioidomicose**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador : Prof. Dr. James Venturini

**Botucatu
2021**

Bárbara Casella Amorim

Potencial imunomodulador de substâncias bioativas vegetais na ativação do inflamassoma no contexto da paracoccidioidomicose

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof.Dr.James Venturini

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Amorim, Bárbara Casella.

Potencial imunomodulador de substâncias bioativas vegetais na ativação do inflamassoma no contexto da paracoccidiodomicose / Bárbara Casella Amorim. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: James Venturini

Capes: 40101096

1. Paracoccidiodomicose. 2. Fatores imunológicos.
3. Extratos vegetais. 4. Piper.

Palavras-chave: Extratos vegetais; Inflamassoma;
Paracoccidiodomicose; Piper.

Bárbara Casella Amorim

Potencial imunomodulador de substâncias bioativas vegetais na ativação do inflamassoma no contexto da paracoccidiodomicose

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador Prof. Dr. James Venturini _____

Comissão Avaliadora

Prof(a). Dr(a).
Universidade:
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).
Universidade
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).
Universidade
Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).
Universidade
Assinatura: _____

Botucatu, ___ de _____ de 2021.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe Ivana, por todo o amor e por ser um exemplo de força e caráter.

A todos os profissionais de saúde, pesquisadores e trabalhadores dos serviços essenciais. Obrigada pela dedicação e pela coragem diária.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente aos meus pais, Ivana e Milton, por todo amor destinado a mim e meu irmão.

Ao meu irmão Bruno, minha cunhada Cíntia e meus sobrinhos Artur e Nicolas por todo amor e apoio.

Aos meus primos Felipe, Vinicius, Gabriela, Lucas, Rosana, Mateus, Mariana, Marina e Ana Laura, as minhas tias Rosana, Silvana e Eliana e aos tios Douglas (in memorian), Zé e Ivan. Agradeço todos os dias por ter uma família unida e tão especial.

Minha madrinha “Tatau”, Waldir, Pedro e Gabi. Vocês são incríveis!

Ao meu orientador Dr. James Venturini, por todas as oportunidades, ensinamentos, paciência e principalmente pela amizade. Saiba que serei eternamente grata por tudo.

A professora Dra. Maria Sueli por ter aberto as portas do Lipe, por toda a confiança e motivação que foram muito importantes para a minha caminhada. Muito obrigada de coração!

Aos professores Dr. Rinaldo Poncio Mendes (Dr. Tietê) e Dr. Ricardo Souza Cavalcante por todos os ensinamentos e oportunidades. Foi muito importante acompanhar profissionais que se dedicam tanto e de coração aos pacientes.

Ao Laboratório de Imunopatologia Experimental – LIPE, UNESP/Bauru, minha casa por sete anos, onde aprendi e vivi as melhores experiências, aprendizados. Lá entendi a responsabilidade de se trabalhar com a ciência e principalmente, o primeiro lugar que me senti pertencendo verdadeiramente a algo.

A Debbie, Amanda, Angela, Thais, Camila, Luiza e Nara Lígia por todos os ensinamentos e amizade. Vocês foram essenciais na minha jornada! Muito obrigada!

Aos amigos que o Lipe me deu: Laysla, Julia, Pedro, Babizinha, Rodolfo, Victor, Gaby, Angelinha, Adriely, Silas, Karol Souza, Tati, Vitória e Luiz Gustavo, Lost, Raul e Caio, muito obrigada por toda amizade e ajuda. Tê-los ao meu lado foi fundamental!

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru, por todo o apoio, oportunidades e por nos acolherem em um momento tão delicado. Agradeço especialmente ao Vagner, Daniel, Ralph, David e aos professores Dr. Alexandre Legendre, Dr. Daniel Rinaldo e Dr. Flávio Caires. Muito obrigada!

A todos os funcionários, alunos, gatinhos (Verinha em especial), cachorros e demais bichinhos da UNESP de Bauru. Sentirei muita falta das caminhadas em meio aquele lugar cheio de cor e amor!

A Karol e Thainá por toda amizade e por terem ficado ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, Ana Roberta, Vanessa, Flávia, Fer, Heide, Cássia, Carol, Dani, Ariana, Juliana, Fábio e Néias. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Gostaria de agradecer especialmente ao meu amigo Jonatas. Eu tenho muita sorte em ter você ao meu lado, saiba que seu apoio e companheirismo foram muito importantes nos últimos anos. Você é incrível, nunca se esqueça disso!

A minha amiga Ana Roberta que foi essencial nessa caminhada.

Aos meus queridos alunos meu agradecimento por me ensinarem tanto.

Aos colaboradores deste trabalho: Prof. Dr. Daniel Rinaldo, Profa. Dra. Maysa Furlan, Amanda Ribeiro, Débora de Fátima Almeida, Vitória Caroline, Luiz Gustavo Ferreira, Adriely Primo, Jonatas Perico, Karoline Reis e Thainá Paixão.

Aos amigos do ILSL, Amanda, Eloise, Bruna, Mariane, Gra, Priscila Ballalai, Keren (in memoriam) e as pesquisadoras Dra. Ana Carla, Dra. Ida, Dra. Vânia e Dra. Maria Renata. Muito obrigada pelo acolhimento e parceria!

Aos companheiros de Botucatu: Tati, Drika, Bia, Camila, Lariza, Priscila, Vanessa, Ricardo e Mari. Obrigada pela parceria e pelos bons momentos compartilhados.

A Mariana Gatto e Adriele Dandara Levorato Vinche pela contribuição no exame geral de qualificação.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação e especialmente a Bruna Quirino Jorgetto por toda ajuda a nós destinada.

Aos funcionários do Departamento de Doenças Tropicais e aos demais funcionários da Faculdade de Medicina de Botucatu pela ajuda quando necessário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2016/17627-4, pelo apoio financeiro.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”
Marie Curie

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*. É uma doença endêmica na América Latina e que se apresenta predominantemente em indivíduos do sexo masculino (90%) com idade entre 30 e 60 anos, sendo sua maioria constituída por trabalhadores rurais que se encontram em fase produtiva no trabalho. As principais formas clínicas da doença são aguda/subaguda e crônica. A busca por novos fármacos é uma constante na sociedade moderna, tendo em vista tanto a existências de doenças que ainda não têm tratamento e a necessidade de drogas mais potentes e/ou que apresentem menos efeitos colaterais, que as já conhecidas. Recentemente, nosso laboratório iniciou estudos avaliando o efeito de substâncias vegetais bioativas nesse contexto. Utilizando cultura de monócitos humanos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS), verificamos que extratos brutos vegetais das espécies *Piper*, *Peperomia* e *Davilla* interferem na produção de TNF- α , IL-10 e IL-6, ora aumentando ora diminuindo a liberação dessas citocinas. Esses resultados sugerem que tais substâncias podem atuar alterando os fenótipos das subpopulações de macrófagos M1 e M2. Do mesmo modo, alguns dos extratos utilizados induziram diminuição na produção de IL-1 β , evidenciando interferência na ativação dos inflamassomas. Considerando que tanto a ativação do inflamassoma como a polarização de macrófagos são elementos chaves na patogênese e cronificação das doenças inflamatórias, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial imunomodulador de extratos brutos, frações, e/ou substâncias isoladas de espécies vegetais do gênero *Piper* sobre esses mecanismos. Para estudar sua ação sobre o NLRP3-inflamassoma, macrófagos derivados da linhagem THP-1, foram desafiados com LPS, ATP, inibidores e, ou, substâncias bioativas. Para avaliar a ação das substâncias na polarização macrofágica, macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram polarizados em M1 e desafiados com as substâncias bioativas. Nossos resultados mostraram que as substâncias bioativas provenientes da *Piper tuberculatum* possuem efeito modulador, seja atuando na ativação do inflamassoma, inibindo a produção da IL-1 β , ou no aumento de moléculas importantes no reconhecimento de patógenos e desenvolvimento da resposta imune, como CD40, e TLR-2 e 4. Em conjunto nossos resultados indicaram potencial imunomodulador promissor dessas substâncias, destacando-se a piplartina.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose, extratos vegetais, inflamassoma, *Piper*, atividade macrofágica

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*. It is an endemic disease in Latin America and occurs predominantly in male individuals (90%) aged between 30 and 60 years old, most of them are rural workers in the productive phase. The main clinical forms of the disease are acute/subacute and chronic. The search for new drugs is a constant in modern society, considering both the existence of diseases that still have no treatment and the need for more potent drugs and / or that have less side effects than those already known. Recently, our laboratory started studies evaluating the effect of bioactive plant substances in this context. Using culture of human monocytes challenged with lipopolysaccharide (LPS), we found that crude plant extracts of the species *Piper*, *Peperomia* and *Davilla* interfere in the production of TNF- α , IL-10 and IL-6, sometimes increasing or decreasing the release of these cytokines. These results suggest that such substances can act by altering the phenotypes of the subpopulations of macrophages M1 and M2. Likewise, some of the extracts used induced a decrease in the production of IL-1 β , showing interference in the inflammasome activation. Considering that both inflammasome activation and macrophage polarization are key elements in pathogenesis and chronification of inflammatory diseases, the present study aimed to evaluate the immunomodulatory potential of crude extracts, fractions, and isolated substances from plant species of the genus *Piper* on these mechanisms. To study their action on the NLRP3 inflammasome, macrophages derived from the THP-1 strain, were challenged with LPS, ATP, inhibitors and, or, bioactive substances. To evaluate the action of these substances in the macrophage polarization, macrophages derived from monocytes of the THP-1 lineage were polarized in M1 and challenged with the bioactive substances. Our results showed that bioactive substances from *Piper tuberculatum* have a modulatory effect, either acting on the activation of the inflammasome, inhibiting the production of IL-1 β , or increasing molecules important in the recognition of pathogens and development of the immune response, such as CD40, and TLR-2 and 4. Together, our results indicated a promising immunomodulatory potential of these substances, highlighting piperlongumine.

Keywords: paracoccidioidomycosis, plant extracts, inflammasome, *Piper*, macrophage activity

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de ativação do inflamassoma.....	7
Figura 2. Estrutura química da piplartina	14
Figura 3. Avaliação do efeito do extrato bruto da <i>Piper tuberculatum</i> e do inibidor do TLR-4 na produção da IL-1 β	21
Figura 4. Avaliação do efeito do extrato bruto da <i>Piper tuberculatum</i> e do inibidor do NLRP3 na produção da IL-1 β	22
Figura 5. Avaliação do efeito do extrato bruto da <i>Piper tuberculatum</i> e inibidor da Caspase-1 na produção da IL-1 β	22
Figura 6. Avaliação do efeito da fração acetato da <i>Piper tuberculatum</i> Jacq e do inibidor do TLR-4 na produção da IL-1 β	24
Figura 7. Avaliação do efeito da fração acetato da <i>Piper tuberculatum</i> Jacq e do inibidor do NLRP3 na produção da IL-1 β	24
Figura 8. Avaliação do efeito da fração acetato da <i>Piper tuberculatum</i> Jacq e do inibidor da Caspase-1 na produção da IL-1 β	25
Figura 9. Avaliação do efeito da piplartina, substância isolada da <i>Piper tuberculatum</i> e do inibidor do TLR-4 na produção da IL-1 β	26
Figura 10. Avaliação do efeito da piplartina, substância isolada da <i>Piper tuberculatum</i> e do inibidor do NLRP3 na produção da IL-1 β	26
Figura 11. Avaliação do efeito da piplartina, substância isolada da <i>Piper tuberculatum</i> e do inibidor do NLRP3 na produção da IL-1 β	27
Figura 12. Expressão de moléculas de superfície de macrófagos M0 e M1	32
Figura 13. Distribuição de moléculas de superfície em macrófagos M1.....	34

Figura 14. Expressão de moléculas de superfície de macrófagos M1 36

Figura15. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície de macrófagos M1 37

Figura16. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície de macrófagos M1 38

Figura17. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície de macrófagos M1 39

Lista de abreviaturas

PCM – Paracoccidiodomicose
P. americana – *Paracoccidioides americana*
P. restrepienses – *Paracoccidioides restrepiensis*
P. venezuelensis – *Paracoccidioides venezuelensis*
FA – Forma aguda/subaguda
FC – Forma crônica
Th - T helper
IFN- γ : Interferon-gamma
IL – Interleucina
Ig – Imunoglobulina
FcR – Receptores para imunoglobulina g
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
TGF- β 1: Fator de transformação do crescimento beta 1
FGFb: Fator de crescimento de fibroblasto básico/ Basic fibroblast growth factor
PRRs – Receptores de reconhecimento padrão
TLR – Receptor tipo *Toll*
NLR – Receptor tipo *Nod*
PYD – Domínio Pirina
CARD – Domínio de recrutamento de caspase
PAMP – Padrão molecular associado a patógeno
DAMP – Padrão molecular associado a dano
ATP – Adenosina trifosfato
ASC – Proteína adaptadora associada a apoptose
NF- κ B – Fator de transcrição kappa B
NETs - *Neutrophil extracellular traps*
CASP-1 – Caspase 1
TIMPs - : Inibidor tecidual de metaloproteinase
MEC – Membrana extracelular
LPS – Lipolissacarídeo
MHCII – Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MMP-1 - Metaloproteinase – 1
THP-1 – Linhagem celular de monócitos humanos
PMA - Forbol 12- miristato 13-acetato
EBEtOh – Extrato Bruto etanólico
FAcOEt – Fração acetato de etila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Paracoccidiodomicose	1
1.2 Imunidade na PCM.....	3
1.3 Inflamassoma	5
1.4 Inflamassoma e infecções fúngicas.....	7
1.5 Plasticidade Macrofágica	9
1.6 Macrófagos polarizados e doenças inflamatórias.....	11
1.7 Extratos vegetais com potencial terapêutico	12
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4. CAPÍTULO I	20
4.1 RESULTADOS.....	20
4.2 DISCUSSÃO	28
5. CAPÍTULO II	31
5.1 RESULTADOS.....	31
5.2 DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

A busca por novos fármacos é uma constante necessidade da sociedade moderna tendo em vista a obtenção de drogas para doenças que ainda não se tem tratamento ou que sejam mais potentes ou, ainda, que apresentem menos efeitos colaterais. O desenvolvimento de uma nova droga é dividido em várias etapas que incluem: (1) descoberta/caracterização de um composto com atividade terapêutica; (2) estudos pré-clínicos e (3) estudos clínicos. Introduzir um novo fármaco na área terapêutica é um processo longo e bastante oneroso (Ferreira *et al.*, 2009). O presente estudo se enquadra em um estudo pré-clínico, que utiliza modelo *in vitro* de inflamação, com uma linhagem celular, permitindo identificar novas drogas com potencial imunomodulador. Para o presente estudo foram empregados extratos brutos e substâncias isoladas de espécies vegetais do gênero *Piper*.

1.1. Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM), descrita por Adolfo Lutz em 1908, é uma micose sistêmica, granulomatosa, causada pelos fungos termodimórficos pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* (Lutz, 1908; Teixeira *et al*, 2014). Em 2014 este gênero era composto por duas espécies *Paracoccidioides lutzii* e *Paracoccidioides brasiliensis*, sendo o último constituído por um complexo de cinco agrupamentos filogenéticos classificados como espécies crípticas: S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4 (Matute *et al*, 2015; Muñoz, 2016). Em 2017, Turissini e colaboradores, baseado por estudos de genealogia genética nuclear e mitocondrial, propuseram três novas espécies para PS2, PS3 e PS4, sendo *P. americana*, *P. restrepienses* e *P. venezuelensis*, respectivamente. Além disso as

espécies S1a e S1b foram classificadas como *P. brasiliensis* (Turissini *et al*, 2017).

A infecção ocorre pela inalação de esporos e fragmentos de hifas (forma micelial infectante) que, ao atingirem os pulmões, se transformam em fungos da fase leveduriforme (forma leveduriforme patogênica) (Bagagli *et al*, 2003). Os dados epidemiológicos revelam que a doença é endêmica na América Latina, com elevada prevalência no Brasil, Venezuela e Colômbia, afetando predominantemente indivíduos do sexo masculino (80% no Brasil), com idade entre 30 e 60 anos (Martinez, 2015). Nas mulheres com idade reprodutiva, o hormônio feminino estrógeno apresenta papel protetor, inibindo a transformação do fungo da fase micelial para a fase leveduriforme, favorecendo a ação de células fagocíticas, principalmente neutrófilos (Aristizabal *et al*, 1998, 2002). O principal grupo acometido pela doença são os trabalhadores rurais, em fase produtiva, que ao desenvolverem a doença, deixam de exercer suas atividades por problemas respiratórios, levando a diversos problemas socioeconômicos e psicológicos ainda subestimados.

Existe considerável variabilidade clínica entre pacientes com PCM, suas formas clínicas variam de aguda / subaguda (FA) a crônica (FC). A FC é mais prevalente (cerca de 75% dos casos) e afeta principalmente adultos do sexo masculino acima de 30 anos, sendo os pulmões e mucosa do trato aerodigestivo superior os principais órgãos/tecidos afetados (Mendes *et al*, 2017). Em geral, a FC ocorre devido a reativação de focos latentes (reinfecção endógena), ou seja, o hospedeiro desenvolveu uma resposta imune adaptativa protetora Th1 / Th17 a *Paracoccidioides* spp. (de Castro *et al*, 2013) que foi efetivo por um tempo determinado. Esses pacientes também exibem intensa produção de citocinas pró-

inflamatórias que induzem efeitos deletérios ao invés de proteção (de Castro *et al*, 2013). Além disso, pacientes com FC / PCM apresentam sequelas, incluindo enfisema e fibrose (Mendes *et al*, 2017).

1.2. Imunidade na PCM

A imunidade do hospedeiro frente aos fungos do gênero *Paracoccidioides* está relacionada a três aspectos fundamentais: 1) a PCM é doença endêmica e acomete indivíduos saudáveis, isto é, que não apresentam condição imunossupressora prévia, 2) o comprometimento da resposta imune está associado à deficiência específica a antígenos do fungo, ou seja, o paciente possui imunidade preservada para outros antígenos. (Bernard *et al*, 1996), 3) a resposta do indivíduo a infecção fúngica depende ainda de outros fatores como: carga genética, gênero, estado nutricional e tamanho do inóculo inalado.

A morte do *Paracoccidioides* spp ocorre pela ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que são produzido pelos macrófagos (Carmo *et al*, 2006), e potencializados pela resposta imune adaptativa do tipo Th₁, que é caracterizada pela produção de IFN- γ pelos linfócitos ativados, atraídos para o sítio da lesão. Qualquer deficiência ou alteração nesse processo leva ao estabelecimento da doença e a sua progressão. Além disso, com a deficiência da resposta Th₁, que em geral inibe a produção de anticorpos, os pacientes passam a apresentar títulos elevados de anticorpos específicos circulantes.

O comportamento imunológico é distinto nas formas aguda/subaguda (FA) e crônica (FC) (Mota *et al*, 1985, 1988; Mamoni e Blotta, 2006; de Castro *et al*, 2013). A forma aguda/subaguda acomete crianças, adolescentes e adultos jovens que apresentam história clínica de curta duração e exibe manifestações clínicas

compatíveis com o comprometimento do sistema fagocítico mononuclear. Observa-se predomínio da produção de citocinas do perfil Th₂/Th₉ (IL-4, IL-5 e IL-9). A produção elevada dessas citocinas acentua a deficiência da resposta imune celular, levando à ausência de reatividade frente a antígenos de *Paracoccidioides* spp. Além disso, as citocinas de perfil Th₂/Th₉ induzem produção muito elevada de anticorpos do isotipo IgG4 (Juvenale, 2001). Considerando que este isotipo apresenta capacidade de fixação de complemento reduzida e pequena afinidade pelos receptores FcR, a fagocitose e a eliminação do fungo, tornam-se comprometidas.

A forma crônica, que ocorre devido à reativação de focos latentes, isto é, após o hospedeiro ter organizado uma resposta imune adaptativa eficiente frente ao *Paracoccidioides* spp, apresenta instalação lenta e progressiva.. Apresentam intensa produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-17 e de peróxido de hidrogênio. Embora esses mediadores sejam importantes para a eliminação do fungo, sua superprodução induz efeitos deletérios e não conferem proteção. A produção de anticorpos também pode estar elevada, e se caracteriza por imunoglobulinas dos isotipos IgG1 e IgG2 (20), que possuem maior capacidade de fixação de complemento e maior afinidade pelos receptores FcR (IgG1 > IgG2 > IgG4). Embora esse conjunto de elementos seja importante para a eliminação do fungo, a capacidade de lise microbiana não acompanha a multiplicação do fungo e o indivíduo adocece. Por se tratar de processo inflamatório crônico, esses pacientes, em geral, já apresentam fibrose logo no primeiro atendimento clínico, quando se observa produção mais acentuada de TGF- β ₁ e do fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) (Venturini *et al*, 2014).

1.3. Inflamassoma

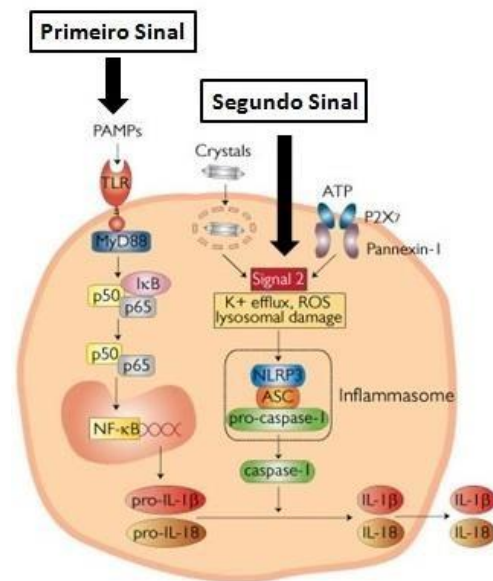
Diferentemente das demais citocinas, a produção de IL-1 β e IL-18 é realizada por uma plataforma multiprotéica intracelular denominada inflamassoma (Martinon *et al*, 2002). A ativação do inflamassoma ocorre por um sistema sofisticado de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que estão expressos em células como macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais. Famílias já descritas dos PRRs incluem receptores do tipo *toll-like* (TLRs), de lectinas do tipo- C e receptores *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like* (NLRs) com suas sub-famílias NOD, NLRP e IPAF (Medzhitov e Janeway, 2002). Os receptores intracelulares NLRs apresentam, ainda, dois domínios bem característicos denominados domínio pirina (PYD) ou domínio de recrutamento de caspase (CARD). Além de reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), esses receptores detectam fatores endógenos derivados de estresse celular (DAMP), amplamente presentes durante os processos inflamatórios agudos e crônicos. (Aravind *et al*, 2001; Inohara e Nuñez, 2003; Martinon e Tschopp, 2005).

Apesar do número razoável de receptores NLRs que são associados ao inflamassoma, o NLRP3-inflamassoma é o mais estudado, pois apresenta capacidade de responder a um grande número de agonistas que não possuem origem microbiana necessariamente, mas também a sinais endógenos. Estudos demonstram, ainda, que o NLRP3-inflamassoma responde a mudança nas concentrações iônicas celulares, especialmente potássio, além da ativação por cristais de ácido úrico e ATP extracelular (Martinon *et al*, 2009; Gross *et al*,

2011). Além dos receptores, a estrutura do inflamassoma é constituída por moléculas adaptadoras, coletivamente denominada proteína adaptadora associada a apoptose (ASC), molécula pró-caspase e os precursores de IL-1 β e IL-18.

Para que ocorra a ativação do inflamassoma (Fig.1) e como consequência a liberação da IL-1 β e IL-18 são necessários dois sinais distintos em que pode-se observar a complementaridade entre os papéis das diferentes famílias de PRRs (Martinon *et al*, 2009; Gross *et al*, 2011; Bauernfeind e Hornung, 2013). O primeiro sinal é o reconhecimento de PAMPs pelos PRRs (como por exemplo, TLRs) que leva a ativação da via NF- κ B com transcrição e tradução das moléculas pró-IL-1 β e pró-IL-18. Um segundo sinal, usualmente associado aos DAMPs, é reconhecido pelos receptores intracelulares NLRs que recrutam os demais componentes do inflamassoma e, assim, tem-se a clivagem, via caspase-1, das citocinas nas suas formas ativas (Martinon *et al*, 2009; Gross *et al*, 2011; van de Veerdonk *et al*, 2011; Bauernfeind e Hornung, 2013). Considerando o envolvimento da IL-1 β na patogênese de doenças inflamatórias (Guo *et al*, 2015; Schett *et al*, 2016) e neurodegenerativas (Freeman e Ting, 2016) o inflamassoma representa um mediador crítico nos processos inflamatórios e, portanto, é um alvo terapêutico em potencial (McCoy *et al*, 2016).

Figura 1- Modelo de ativação do inflamassoma



Fonte: Invivogen, 2009.

1.3. Inflamassoma e infecções fúngicas

Locais como pele e mucosa são frequentemente expostos à fungos e o sistema imune do hospedeiro é o responsável por distingui-los entre os que fazem parte da microbiota natural e aqueles que podem causar doenças mais graves. Apesar de ainda ser pouco estudado, o inflamassoma tem apresentado um papel importante no equilíbrio entre a colonização simbiótica e infecção por fungos, como por exemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (Hise *et al*, 2009; Joly *et al*, 2009; Gross *et al*, 2009; Said-Sadler *et al*, 2010; Lei *et al*, 2013).

Neutrófilos participam dos eventos iniciais da infecção fúngica atuando na fagocitose de conídios e leveduras e, ou, na liberação de diversas enzimas proteolíticas e NETs (*neutrophil extracellular traps*) em respostas às hifas e micélios (Della Coletta *et al*, 2015; Bachiega *et al*, 2016). Nesta fase inicial da infecção, a IL-

1 β não é dependente do NLRP3-inflamassoma pois os neutrófilos são capazes de liberar uma enzima denominada proteinase 3 (PR3) que também possui capacidade de clivar a forma inativa da IL-1 β na sua forma ativa (Joosten *et al*, 2009). Nos estágios mais tardios da infecção, quando a resposta inflamatória torna-se mais dependente das células mononucleares, o inflamassoma é o responsável por atuar na liberação da IL-1 β e IL-18 que contribui na polarização das respostas Th17e Th1 respectivamente (van de Veerdonk *et al*, 2011).

Estudos experimentais recentes têm relacionando a PCM e o inflamassoma. Em 2013, Tavares *et al*. demonstraram pela primeira vez que o NLRP3-inflamassoma é ativado pelo *P. brasiliensis* em células dendríticas murinas e que esse mecanismo seria de grande importância para a defesa do organismo contra o fungo. Feriotti *et al*. (2015) observaram que a expressão do receptor Dectina-1 induz expressiva ativação do NLRP3-inflamassoma e que esse mecanismo estaria associado com a resistência do hospedeiro frente ao fungo e Ketelut-Carneiro *et al* (2015) demonstraram que a IL-18 liberada pela ativação do NLRP3-inflamassoma induz a uma resistência antifúngica pelo hospedeiro (Tavares *et al*, 2013; Feriotti *et al*, 2015; Ketelut-Carneiro, 2015). Castro *et al*. demonstraram a ativação do NLRP3-inflamassoma em células dendríticas derivadas de monócitos obtidos de indivíduos saudáveis desafiadas por *P. brasiliensis* (de Castro *et al*, 2018), confirmando pela primeira vez a ativação do inflamassoma em células humanas, corroborando assim os achados encontrados nos primeiros estudos experimentais (Tavares *et al*, 2013; Feriotti *et al*, 2015). Em um recente trabalho publicado pelo nosso grupo, observamos um aumento constitutivo nos níveis de mRNA de genes do NLRP3-inflamassoma em monócitos de pacientes com PCM quando comparados a controles saudáveis. Foi observada semelhante expressão intracelular de proteínas

também associadas ao inflamassoma, NLRP3, CASP-1, ASC e IL-1B em monócitos de pacientes com PCM e controles de fumantes. A expressão aumentada de NLRP3 e ASC foi observada em monócitos de pacientes com PCM sob hipóxia em comparação com controles de fumantes. Pela primeira vez, demonstramos que monócitos de pacientes com a forma crônica da PCM (CF- PCM) estavam associados a expressão aumentada de componentes do NLRP3-inflamassoma (Amorim *et al*, 2020).

1.5. Plasticidade macrofágica

Macrófagos são células do sistema imune presentes em diversos tecidos e que apresentam múltiplas funções, sendo imprescindíveis em diversos processos fisiológicos, como por exemplo, na inflamação e na reparação tecidual (Mosser e Edwards, 2008; Shiratori, 2017). Por esse motivo são até mesmo considerados “reguladores mestres da inflamação e fibrose” (Wynn e Barror, 2010). Nos tecidos são geralmente encontrados próximos aos miofibroblastos (Ramm *et al.*, 1998; Wynn e Barror, 2010) e são capazes de produzir mediadores pró-fibróticos, como TGF- β 1 e PDGF que atuam diretamente nos fibroblastos.

Uma das características marcantes dos macrófagos é a capacidade de se ativar e diferenciar em subtipos com propriedades distintas: 1) macrófagos M1 – com propriedades pró-inflamatórias e 2) macrófagos M2 – com propriedades anti- inflamatórias (Shiratori, 2017).

Durante uma infecção, macrófagos migram até o tecido lesionado e em contato com as substâncias presentes no microambiente tecidual, como citocinas de perfil Th1 (TNF e IFN- γ) e estímulos microbianos como o lipolissacarídeo (LPS), se diferenciam em macrófagos tipo M1, ou classicamente

ativados, que produzem citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-15, IL-23 e IL-1 β), apresentam alta capacidade de apresentação antigênica e produção de reativos de oxigênio e nitrogênio (Shiratori, 2017; Arorra *et al.*, 1989; Chizzolini *et al.*, 2000; Gratchev *et al.*, 2001). Quando a infecção já está controlada, as citocinas e estímulos presentes no microambiente tecidual se alteram na presença dos mediadores IL-4, IL-10, IL-13 e glicocorticoides que promovem a diferenciação macrófágica para o perfil M2, responsável pela produção de citocinas anti-inflamatórias, limpeza de células apoptóticas e remodelação tecidual (Mantovani *et al.*, 2004; Arorra *et al.*, 1989; Shiratori, 2017).

Os macrófagos M2, ou alternativamente ativados, ainda podem ser subdivididos em: M2a, M2b e M2c (Arorra *et al.*, 1989; Shiratori, 2017). O fenótipo M2a é induzido pelas citocinas IL-4 e IL-13 que promovem a regulação de moléculas do MHC-II e produção de metaloproteinase - 1 (MMP-1). Essas células apresentam papel importante na proliferação celular, reparo tecidual e fibrogênese. (Chizzolini *et al.*, 2000; Gratchev *et al.*, 2001). O fenótipo M2b é induzido pela exposição à imunocomplexos em combinação com LPS ou ligantes do receptor IL-1R. Essas células apresentam baixa produção de IL-12 e alta produção de IL-10 (Anderson e Mosser, 2002). Já o fenótipo M2c é induzido na presença de glicocorticoides, TGF- β ou IL-10. Essas células regulam negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentam a atividade de limpeza de restos celulares (Arorra *et al.*, 1989).

Uma estratégia muito utilizada para o estudo dos fenótipos macrófágico é a diferenciação *in vitro* utilizando monócitos humanos ou linhagens celulares (Stossif *et al.*, 2012; Shiratori, 2017). Na literatura, já está bem estabelecido que é possível utilizar linhagens de células de monócitos como a THP-1 (ATCC®

TIB-202) e diferenciá-las primeiramente em macrófagos M0 (indiferenciados) pela exposição ao de forbol 12- miristato 13-acetato (PMA). E depois polarizá-los em M1 e M2 com o uso das respectivas citocinas recombinantes características de cada perfil (Stossif *et al.*, 2012; Genin *et al.*, 2015; Shiratori, 2017).

1.6. Macrófagos polarizados e doenças inflamatórias

A heterogeneidade dos macrófagos tem sido atrelada ao desenvolvimento e manutenção de diversas doenças inflamatórias, como doenças infecciosas crônicas, diabetes mellitus do tipo II (DM- II), doença arterial coronária, doenças neuro- degenerativas e algumas neoplasias. (Schultze *et al.*, 2015).

Os macrófagos M1, por exemplo, são as células descritas como cruciais no desenvolvimento do DM-II. A obesidade leva a infiltração de macrófagos M1 no tecido adiposo que, por secretarem citocinas pró-inflamatórias, induzem a resistência à insulina (Cucak *et al.*, 2014). Na esclerose múltipla tem sido descrito que, após o dano no sistema nervoso central (SNC), os macrófagos residentes (micróglia) são funcionalmente ativados e, assim, se tornam células-chave na propagação da resposta neuro-inflamatória. Nas lesões desmielinizantes, observadas na esclerose múltipla, os macrófagos e micróglia ativados estão presentes em abundância (van der Valk and De Groot, 2000), indicando, assim, o papel dessas células na formação da lesão axonal e, também, no mecanismo de reparo tecidual (Kigerl *et al.*, 2009; Rawji and Yong, 2013). Em neoplasias, a participação dos macrófagos M1 tem sido identificada pela infecção crônica por *Helicobacter pylori* no estômago que dá origem a persistência da inflamação por monócitos/macrófagos M1, resultando no início da tumorigenese (Cordon-Cardo and Prives, 1999; Peek and Blaser, 2002).

Por outro lado, nas neoplasias, o que se observa com maior frequência, é a presença de macrófagos M2. No microambiente tumoral, os macrófagos são polarizados em M2 pelas células tumorais, linfócitos Th2 e linfócitos B que produzem citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 (Hagemann *et al.*, 2005; Hagemann e Lawrence, 2009). Além disso, os macrófagos M2 produzem fatores pró- tumorais como IL-8, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteinases de matriz (MMP). Esses mediadores em associação com produtos secretados por macrófagos associados a tumores e células mielóides, como IL-10, TGF- β e arginase-1, promovem o crescimento e metástase tumoral (Hume, 2015; Nardin and Abastado, 2008).

Considerando que macrófagos são células predominantemente presentes no ambiente inflamatório e citocinas e quimiocinas produzidas por esses fagócitos são os principais mediadores do dano tecidual, essas células tem surgido como reguladores-chave na iniciação, promoção e progressão das doenças inflamatórias. Assim, tem sido amplamente sugerido que os macrófagos podem representar um alvo apropriado para novos tratamentos imunoterápicos (Revisão em Ohashi *et al.*, 2015). Por exemplo, terapias que inibem a infiltração de macrófagos ou sua supressão têm demonstrado eficiência em pacientes com artrite reumatoide e osteoartrite (Barrera *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001).

1.7. Extratos vegetais com potencial terapêutico

O Brasil possui uma biota extremamente rica com aproximadamente 20% de todas as espécies conhecidas no mundo além de milhares de outras espécies ainda não descobertas (Bolzani *et al.*, 2012). Nas duas últimas décadas têm-se observado grande incentivo na busca por novos fármacos a partir de produtos

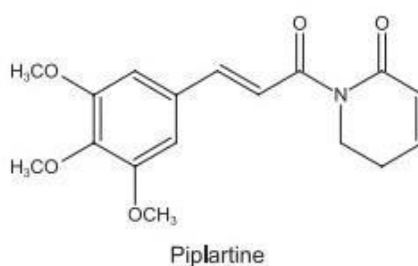
naturais (Cechinel Filho & Yunes, 1998). Ao mesmo tempo, houve um grande desenvolvimento nos métodos analíticos para isolamento e elucidação das estruturas moleculares complexas desses produtos como, por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrofotometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (NMR) (Bolzani *et al.*, 2012). Desse modo, esses avanços resultaram em notável dinamização nos processos que culminaram com a identificação e purificação de muitas substâncias ativas. No entanto, a repercussão biológica desses achados continua sendo um desafio para os pesquisadores, uma vez que seu processo é complexo e lento, pois envolve diversas etapas metodológicas, inúmeras potencialidades a serem exploradas e, ainda, é fundamental que esse processo seja realizado por uma equipe multidisciplinar concatenada (Cechinel Filho & Yunes, 1998). Segundo diversos autores, a descoberta de uma substância com atividade biológica a partir de plantas é facilitada pela orientação de seu uso na medicina popular, isto é, cerca de 75% dos compostos utilizados pelas indústrias farmacêuticas foram isoladas baseadas na medicina tradicional (Farnsworth and Kaas, 1981; Montellano, 1975; Unander *et al.*, 1995).

É de nosso interesse estudar as espécies da família Piperaceae, uma vez que as mesmas têm sido utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças do fígado, epilepsia, antimalárico, problemas dermatológicos, urológicos e diabetes mellitus (Amorim *et al.*, 1988; Stasi, 2002). A família Piperaceae compreende 10 gêneros, com aproximadamente 4000 espécies (López *et al.*, 2010), incluindo os gêneros Piper e Peperomia, com mais de 700 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (De Campos *et al.*, 2005). Diversas classes de metabólitos secundários como alcalóides, amidas,

flavonóides, derivados do ácido benzóico, lignanas, terpenos e ciclopentadionas presentes em diversas espécies de *Piper* são apontados como os possíveis responsáveis pela atividade biológica dessas espécies (Lago *et al.*, 2005). Estudos biológicos demonstraram que estas possuem atividade tripanocida, antimalárica, antifúngica e potenciais antiviral, antioxidante e anti-inflamatório (Amorim *et al.*, 1988; Cotinguiba *et al.*, 2009; de Ferreira-da Cruz *et al.*, 2000; López *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2006). Apesar desses achados, pouco se conhece sobre a ação *in vivo* destes extratos sobre o sistema imunológico.

Dentre as substâncias isoladas do gênero *Piper*, destaca-se a piplartina (Fig.2) que é um alcaloide/amida comumente encontrada em espécies do gênero *Piper* (Gorgani *et al.*, 2017). Na literatura há relatos de diversas atividades, entre elas destacam-se atividade gastroprotetora, leishmanicida, schistosomida, imunomodulador, entre outros (Moraes *et al.*, 2011; Burci *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2018).

Figura 2. Estrutura química da piplartina.



Fonte: Bezerra *et al.*, 2017.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial imunomodulador de substâncias bioativas vegetais na ativação do NLRP3-inflamassoma e na polarização de macrófagos M1.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a ativação do NLRP3-inflamassoma a partir da produção de IL-1 β e IL-18 de monócitos THP1 cultivados na presença de LPS, ATP e, ou, inibidores e desafiados com as substâncias bioativas vegetais.
- Caracterizar o perfil da atividade macrofágica a partir da expressão das moléculas de superfícies CD80, CD163, CD206, CD369, TLR2, TLR4, CD40, CD86 e HLA-DR de macrófagos polarizados em M1 e desafiados com as substâncias bioativas vegetais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do material vegetal. A espécie *Piper tuberculatum* Jacq. é mantida na casa de vegetação do Instituto de Química, Unesp, Araraquara, SP, Brasil e foi identificada pelo Prof. Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidade Pedro Ruiz Gallo – Peru). A exsicata da planta (Kato-163) está depositada no herbário do Instituto de Botânica, São Paulo – SP. As folhas foram coletadas no dia 19 de julho de 2018, das 10h 30m às 11h 00m (21°48'26.9"S 48°11'33.5"W).

3.2. Obtenção do extrato vegetal. Após coleta do material vegetal, as folhas foram secas em estufa de ar circulante a 40° C por cinco dias. Posteriormente, foram pulverizadas obtendo-se 39,97 g. Desse total, 19,69 g foram utilizados no processo de extração por maceração assistida por ultrassom, utilizando como solvente extrator, 350 ml de etanol (EtOH) por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado três vezes. O extrato foi filtrado e concentrado em rotaevaporador a pressão reduzida, obtendo-se 1,200 g de extrato etanólico.

3.3. Obtenção da Fração. O fracionamento do extrato bruto etanólico (EBEtOH) das folhas da espécie *Piper tuberculatum* Jacq foi realizado por extração n-líquido líquido. Pesou-se o extrato bruto, que foi ressuspenso em 150ml de uma solução composta por etanol e água (9:1) e extraído através da partição de solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, acetato de etila e água. Para o presente trabalho utilizamos a fração de acetato de etila (FAcOEt).

3.4. Linhagem celular. Foram utilizados monócitos da linhagem THP-1(ATCC® TIB- 202TM) que foram cultivados e mantidos em meio de cultura RPMI-10

(Sigma-Aldrich) a 37°C e 5% CO₂ e submetidos a diferenciação em macrófagos pela adição de 1 ng/ml de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich) durante 3 horas, seguindo por lavagem com RPMI. As células então foram plaqueadas em placas com 24 poços, e deixadas por 24h em estufa para total aderência.

3.5. Ensaio de ativação do inflamassoma. Após o protocolo de diferenciação, foram adicionados aos macrófagos derivados da linhagem THP-1 as substâncias bioativas em diferentes concentrações: 10 µg/ml de extrato bruto etanólico (EBEtOH) de *Piper tuberculatum*; 1 µg/ml da fração acetato de etila (FAcOEt.) de *P. tuberculatum*; 0.5 µg/ml de piplartina ou os inibidores do inflamassoma, isoliquiritigenin (1 µg/ml) e parthenolide (10 µg/ml), além do inibidor do TLR-4 LPS-RS (1 µg/ml). Após o período de incubação, as células foram submetidas a ativação do inflamassoma pela adição de LPS (10 ng/ml) e ATP (1 mM). Após 3 horas foram coletados os sobrenadantes e as células aderidas foram lisadas para o ensaio de Western Blotting.

3.6. Quantificação de IL-1β. Os sobrenadantes das culturas foram estocados a - 80°C para posterior dosagem da IL-1β e IL-18 que foi realizada através da técnica de ELISA pelo kit DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MI, USA).

3.7. Diferenciação de macrófagos M1. A diferenciação de monócitos em macrófagos M1 utilizando a linhagem THP-1 foi realizada de acordo com Stossi *et al.* (2012) com modificações. Resumidamente, os monócitos foram cultivados na presença de 20 ng/ml de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) por 3 horas e depois submetidos a um descanso em RPMI-10 por 3 dias. Para a polarização

em M1, as células foram incubadas com 30 ng/ml de IFN- γ e 100 ng/ml de LPS por 3 dias. Os macrófagos foram avaliados por citometria de fluxo para a confirmação fenotípica: CD80^{high} (M1) (Buechler *et al.*, 2000; Varin e Gordon, 2009). Após a confirmação fenotípica, foram executadas novas culturas e os macrófagos foram estimulados com 10 μ g/ml de extrato bruto etanólico (EBEtOH) de *P. tuberculatum*; 1 μ g/ml da fração acetato de etila (AcOEt) de *P. tuberculatum*; 0.5 μ g/ml de piplartina e 0.5 μ g/ml de rutina por 24 horas. Posteriormente, as células foram coletadas e submetidas a análise das moléculas de superfície por citometria de fluxo.

3.8. Expressão de moléculas de superfície (citometria de fluxo). As células aderentes foram retiradas das placas utilizando solução PBS-EDTA 2 mM, em banho de gelo e com o auxílio de Cell Scraper (Greiner). As células foram incubadas com anticorpos conjugados a fluorocromos anti-CD80 (Invitrogen; clone 2D10.4), CD206 (Ebioscience; clone 19.2), CD163 (Invitrogen; clone eBioGHI/61), CD14 (MACS Miltenyl Biotec), CD40 (Ebioscience; clone 5C3), CD86 (Ebioscience; clone IT2.2), HLA-DR (Ebioscience; clone LN3), CD369 (Ebioscience; clone 15E2), TLR2 (Ebioscience; clone TL2.1), TLR4 (Ebioscience; clone HTA125) ou controles isotípicos diluídos em *Blocking Buffer* por 20 minutos e a 4°C. Após lavagem com *FACS Buffer* (PBS modificado segundo Dulbecco, 0,1% BSA e 0,1% azida sódica), as amostras foram fixadas em PBS- formalina 4% por 5 minutos. A aquisição foi realizada em FACS Aria TM III (BD Biosciences), no total de 30.000 eventos e os dados analisados no software FlowJo 7.5.5 (Tree Star, Inc).

3.9. Análise estatística. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o nível de significância estabelecido para verificar a hipótese de nulidade será de 5,0%. A comparação de duas amostras dependentes foi feita pelo teste t , enquanto a de mais de duas amostras dependentes foi feita pelo teste ANOVA, com pós-teste de Dunn. (Zar, 2010).

3.10. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências – UNESP/Bauru, pelo parecer 563.575.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados e a discussão serão apresentados em 02 capítulos, conforme segue.

4. CAPÍTULO I

“Influência da pipartina, substância isolada da *Piper tuberculatum* Jacq., na modulação da ativação do NLRP3 inflamassoma”

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir das análises da produção de IL-1 β , a partir de ensaios de inibição do inflamassoma.

4.1. RESULTADOS

4.1.2. Avaliação do efeito do extrato bruto da *Piper tuberculatum* Jacq produção da IL-1 β .

Foram realizados ensaios de produção da IL-1 β em sobrenadante de macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1. Como o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a imunomodulação do inflamassoma pelas substâncias bioativas, para tentarmos elucidar os possíveis mecanismos de ação das substâncias, utilizamos inibidores específicos de componentes do inflamassoma (receptor NLRP3 e Caspase-1), além de inibidor específico do receptor de reconhecimento padrão TLR-4, que atua no reconhecimento do LPS. As células foram tratadas com EBEtOH da *Piper tuberculatum* (10 μ g/ml) ou inibidores por 1 hora, seguido do protocolo de ativação do inflamassoma, com a utilização de LPS (10 ng/ml) e ATP (1 mM). Nossos resultados mostraram diminuição significativa na produção da IL-1 β quando comparamos as células tratadas com

o EBEtOH da *P. tuberculatum* em relação ao controle positivo (somente ativadas com LPS e ATP).

Quando comparamos o controle positivo com as amostras tratadas com os inibidores do TLR-4, NLRP3 e da Caspase-1 encontramos também significativa diminuição da produção da IL-1 β (Fig. 3, 4 e 5).

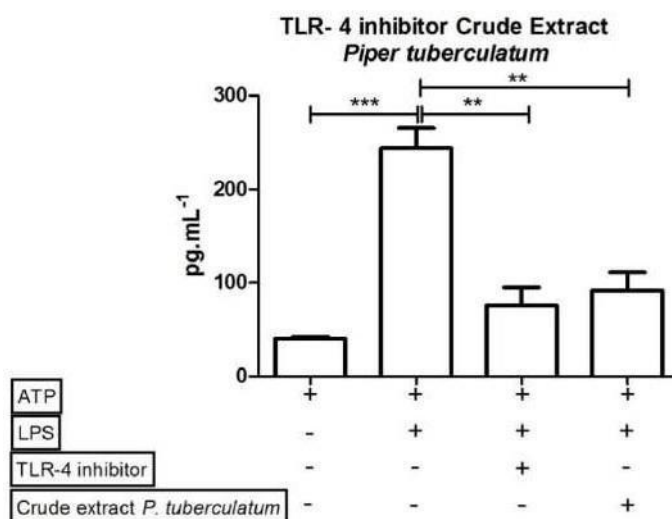


Figura 3. Avaliação do efeito do extrato bruto da *Piper tuberculatum* Jacq e do inibidor do TLR-4 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com o EBEtOH [10 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor do TLR-4[1 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

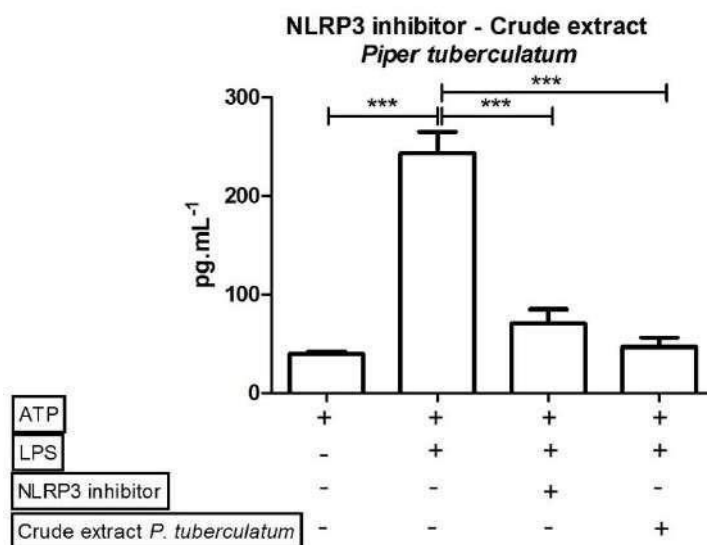


Figura 4. Avaliação do efeito do extrato bruto etanólico da *Piper tuberculatum* Jacq e do inibidor do NLRP3 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com o extrato bruto etanólico [10 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor do NLRP3 [1 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

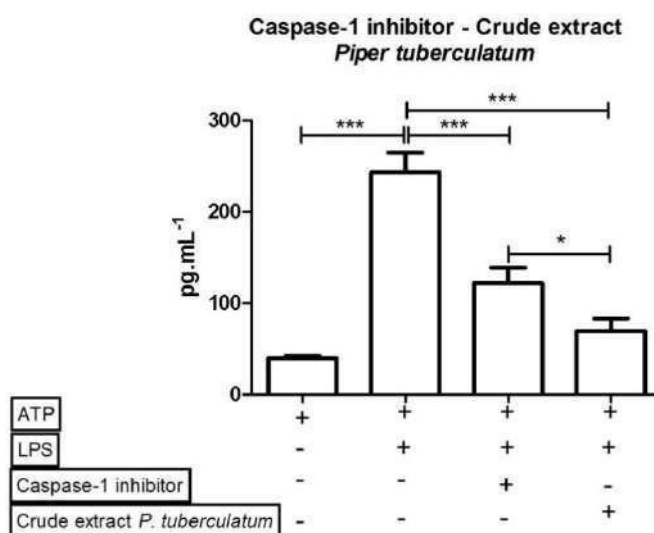


Figura 5. Avaliação do efeito do extrato bruto etanólico da *Piper tuberculatum* Jacq e do inibidor da Caspase-1 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com o extrato bruto etanólico [10 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor da Caspase-1 [10 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

4.1.2. Avaliação do efeito da fração acetato de etila da *Piper tuberculatum* Jacq na produção da IL-1 β .

Para analisarmos o efeito da FAcOEt na produção da IL-1 β as células foram tratadas com a fração acetato da *Piper tuberculatum* [1 μ g/ml] ou inibidores por 1 hora, seguido do protocolo de ativação do inflamassoma com a utilização de LPS (10 ng/ml) e ATP (1 mM).

Observamos diminuição significativa na produção da IL-1 β quando comparamos as células tratadas com a fração acetato da *P. tuberculatum* em relação ao controle positivo (LPS e ATP). Quando comparamos o controle positivo com as amostras tratadas com os inibidores do TLR-4, NLRP3 e da Caspase-1 encontramos também significativa diminuição na produção da IL-1 β (Fig 6, 7 e 8).

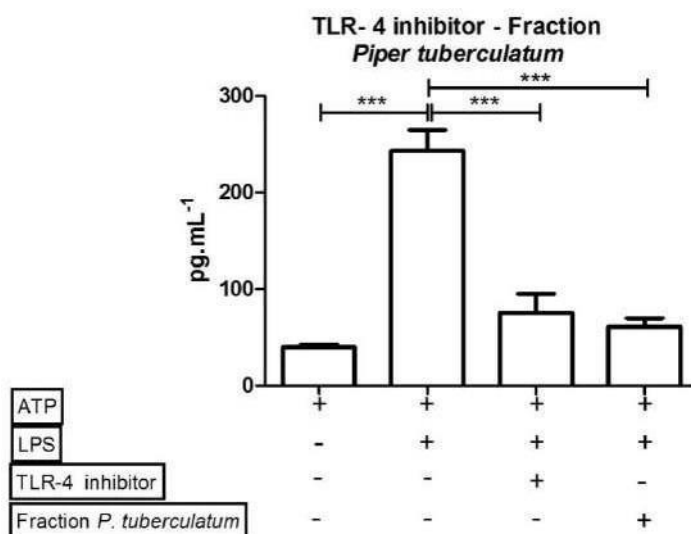


Figura 6. Avaliação do efeito da fração acetato da *Piper tuberculatum* Jacq e do inibidor do TLR-4 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com a fração acetato [1 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor do TLR- 4 [1 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

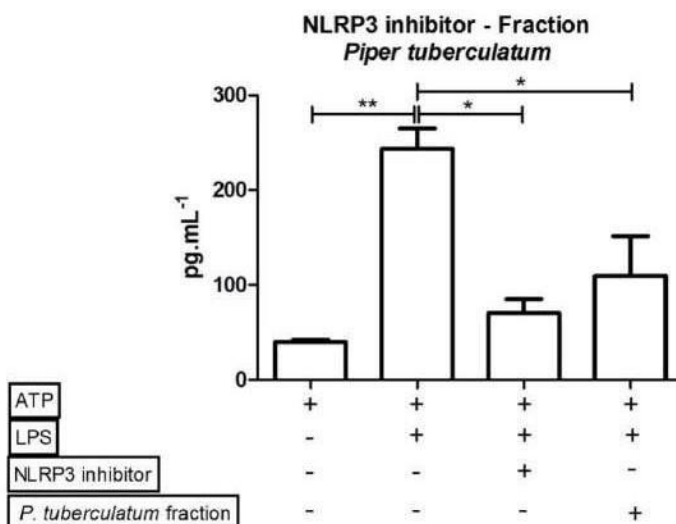


Figura 7. Avaliação do efeito da fração acetato da *Piper tuberculatum* Jacq e do inibidor do NLRP3 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com a fração acetato[1 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor do NLRP3 [1 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

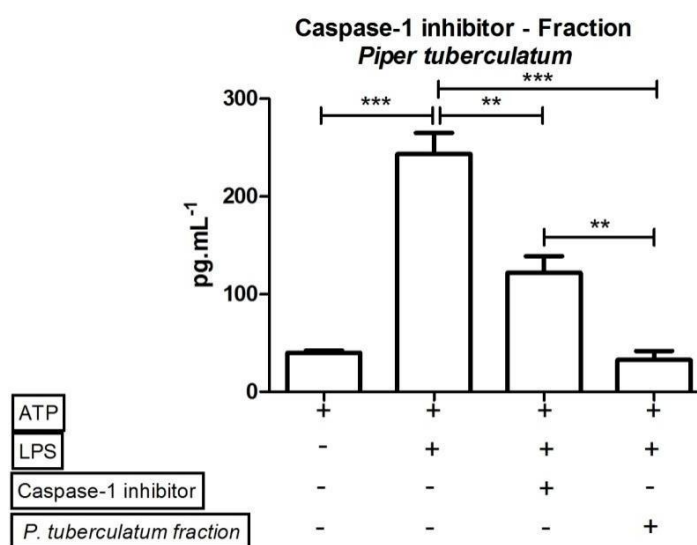


Figura 8. Avaliação do efeito da fração acetato da *Piper tuberculatum* Jacq e do inibidor da Caspase-1 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com a fração acetato [1 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor da Caspase-1 [10 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

4.1.3. Avaliação do efeito da piplartina, substância isolada da *Piper tuberculatum* Jacq, na produção da IL-1 β .

As células foram tratadas com piplartina (0,5 μ g/ml) ou inibidores por uma hora, seguido do protocolo de ativação do inflamassoma com a utilização de LPS (10 ng/ml) e ATP (1 mM).

Assim como na avaliação do EBEtOH e da FAcEt da *Piper tuberculatum* Jacq, as células tratadas com a piplartina apresentaram menor produção de IL-1 β em comparação ao controle positivo. Quando comparamos o controle positivo com as amostras tratadas com os inibidores do TLR-4, NLRP3 e da caspase-1 encontramos também significativa diminuição na produção da IL-1 β (Fig.9, 10 e 11).

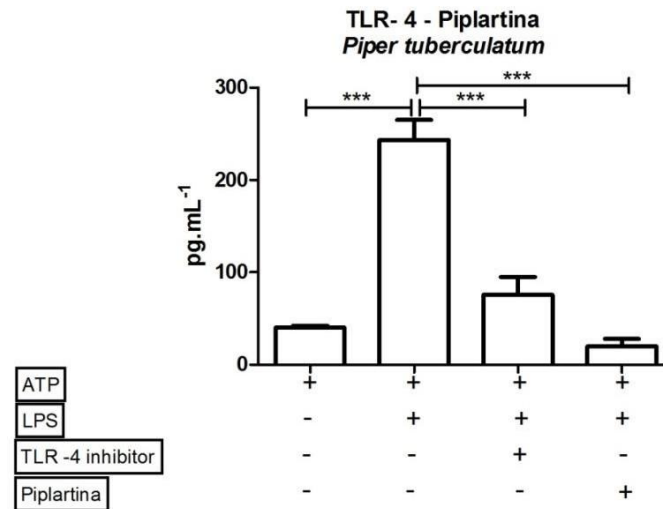


Figura 9. Avaliação do efeito da piplartina, substância isolada da *Piper tuberculatum* Jacq, e do inibidor do TLR-4 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com a piplartina [0,5 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor do TLR-4 [1 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

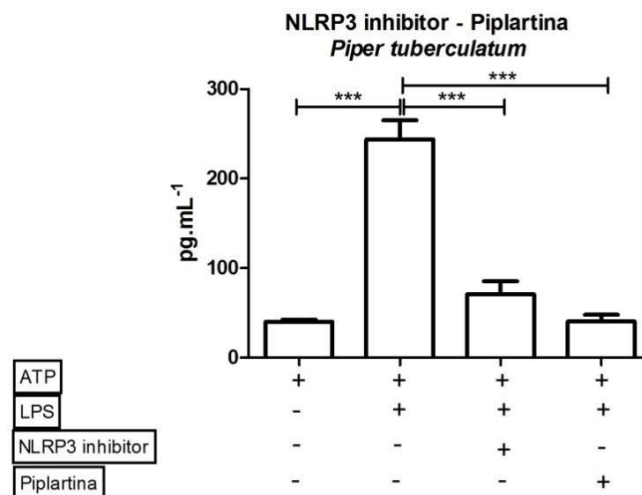


Figura 10. Avaliação do efeito da piplartina, substância isolada da *Piper tuberculatum* Jacq, e do inibidor do NLRP3 na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com a piplartina [0,5 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor do NLRP3 [1 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Os experimentos foram realizados em triplicada e duas repetições.

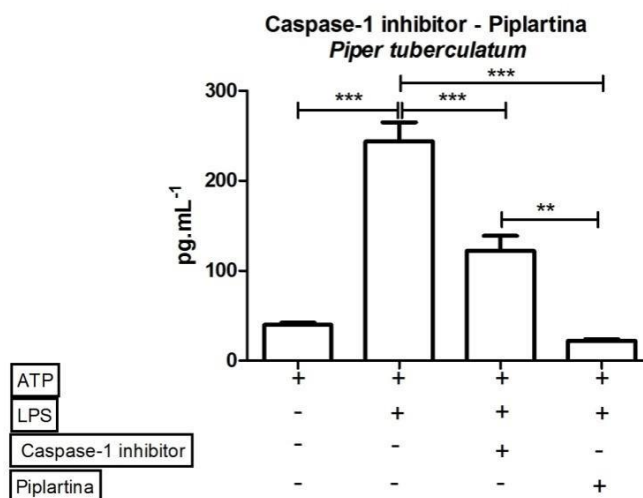


Figura 11. Avaliação do efeito da piplartina, substância isolada da *Piper tuberculatum* Jacq na produção da IL-1 β . Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 foram tratados com a piplartina [0,5 μ g/ml], e, ou, tratados com o inibidor da Caspase-1 [10 μ g] por 1 hora e seguido do protocolo de ativação do inflamassoma sendo desafiados com LPS e ATP por 3 horas. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA para amostras dependentes (valor de p) e o pós-teste foi realizado utilizando teste de Dunnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Os experimentos foram realizados em triplicada e com duas repetições.

4.2. DISCUSSÃO

A ativação do inflamassoma é um dos mecanismos de maturação e liberação da IL-1 β e a sua desregulação aparece como um mecanismo imunológico importante que está envolvido na patogênese de várias doenças, entre elas, doenças inflamatórias, pulmonares e infecciosas. No contexto das infecções fúngicas, podemos destacar os estudos experimentais que associaram o inflamassoma como um mecanismo de proteção do hospedeiro frente a infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Tavares *et al.*, 2013; Ferioti *et al.*, 2015; Ketelut-Carneiro *et al.*, 2015). Recentemente nosso grupo publicou um trabalho em que, diferentemente dos resultados vistos nos estudos experimentais, tivemos resultados que nos forneceram uma compreensão além dos processos iniciais da interação fungos-células humanas e incluiu vários aspectos da complexidade da PCM observada em pacientes, como o uso do tabaco, fibrose pulmonar e cronicidade da inflamação durante e após o tratamento. Pela primeira vez, demonstramos que monócitos de pacientes com CF-PCM estavam associados a expressão aumentada de componentes do NLRP3-inflamassoma (Amorim *et al.*, 2020).

O modelo de ativação do inflamassoma, consiste em duas etapas. Na primeira, chamada de *priming*, acontece o reconhecimento de um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) por receptores de reconhecimento padrão, como TLR, que induz a expressão gênica do receptor NLRP3, pro-IL-1B e pro-IL-18 via NF- κ B. A segunda etapa consiste em um sinal que irá estimular a organização da estrutura do inflamassoma e posterior ativação da caspase-1, que é a responsável por clivar a pró IL-1 β e pró IL-18 nas suas formas ativas (Martinon, 2009). Partindo deste conhecimento, utilizamos para nosso trabalho o modelo de

ativação do NLRP3-inflamassoma que consiste na utilização do lipopolissacarídeo (LPS) (ativação da primeira etapa) e do ATP (segunda etapa) e com isso pudemos avaliar a performance das substâncias bioativas testadas. Nossos resultados mostraram uma diminuição na produção da citocina IL-1 β , quando comparadas com o nosso controle de ativação do inflamassoma., demonstrando assim uma possível modulação na ativação do inflamassoma pelo extrato bruto, fração acetato e a pipartina, todos provenientes da espécie *Piper tuberculatum*. Para elucidarmos os possíveis mecanismos utilizados por essas substâncias, utilizamos também, inibidores de estruturas relacionadas diretamente na ativação do NLRP3-inflamassoma, como o receptor NLRP3, a caspase-1 e o receptor de reconhecimento padrão TLR-4, que é responsável pelo reconhecimento do LPS. Quando comparamos as células tratadas com as substâncias bioativas e as células tratadas apenas com os inibidores não encontramos diferenças significativas na produção da IL-1 β .

Embora na literatura os trabalhos sobre o tema sejam escassos, observamos que a inibição da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) pode ser uma das estratégias utilizadas por algumas substâncias bioativas. Em 2013, Xiaozhou e colaboradores concluíram que a piperina, alcaloide extraído da *Piper nigrum*, inibiu a produção da IL-1 β através da *downregulation* do NF- κ B em condrócitos na osteoartrite. Já em 2019, Wohn-Jenn Leu e colaboradores verificaram que extratos brutos da espécie *Plectranthus amboinicus* inibiram a maturação e a liberação da IL-1 β através da inibição também do NF- κ B.

Considerando que encontramos atuação similar quando comparamos os efeitos do extrato bruto, da fração acetato e da Piplartina, nossos resultados sugerem que a pipartina seja um dos metabólitos responsáveis por essa

modulação. Não temos até o momento na literatura, artigos que associem a piplartina e a modulação do inflamassoma.

Uma das limitações do trabalho, foi não termos concluído os ensaios de Western Blotting. Na sequência faremos as análises, e assim esperamos além da confirmação da inibição, um maior entendimento sobre os mecanismos de atuação das substâncias bioativas.

Em relação a modulação do inflamassoma, nossos resultados se mostraram promissores e demonstraram uma possível atuação da piplartina na inibição da ativação do inflamassoma e por consequência inibindo também a produção IL-1 β , uma citocinas já conhecida por seu envolvimento na patogênese de várias doenças (Guo *et al.*, 2015; Schett *et al.*, 2016).

5. CAPÍTULO II

“Influência das substâncias bioativas de *P. tuberculatum* Jacq. na polarização dos Macrófagos M1”

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir das análises, por imunofenotipagem, da influência das substâncias bioativas de *Piper tuberculatum* Jacq. na polarização de macrófagos M1.

5.1 RESULTADOS

5.1.1. Macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 exibem aumento da expressão de CD80 na presença de IFN- γ recombinante e lipopolissacarídeo.

Para os ensaios de avaliação da influência das substâncias bioativas no cenário pró e anti-inflamatório, iniciamos a padronização da diferenciação macrofágica de monócitos da linhagem THP-1 em macrófagos. Verificamos que na presença de PMA 20 ng/ml (para M1) durante 48 horas houve diferenciação dos monócitos em macrófagos, sendo possível visualizar a aderência das células por toda a superfície da placa de teste.

Em seguida, iniciamos a padronização da polarização macrofágica em M1 (pró-inflamatório). Após vários ajustes de concentração de citocinas recombinantes e tempo de incubação, realizamos com sucesso a polarização de monócitos da linhagem THP-1 em macrófagos de perfil M1 (Figura 12). Foi possível observar que

a incubação com 30 ng/ml de IFN- γ recombinante e 100 ng/ml de LPS durante 3 dias, gerou um aumento significativo da expressão de CD80, receptor característico de macrófagos de perfil M1 (Stossi et al, 2012; Genin et al, 2015; Shiratori, 2017).

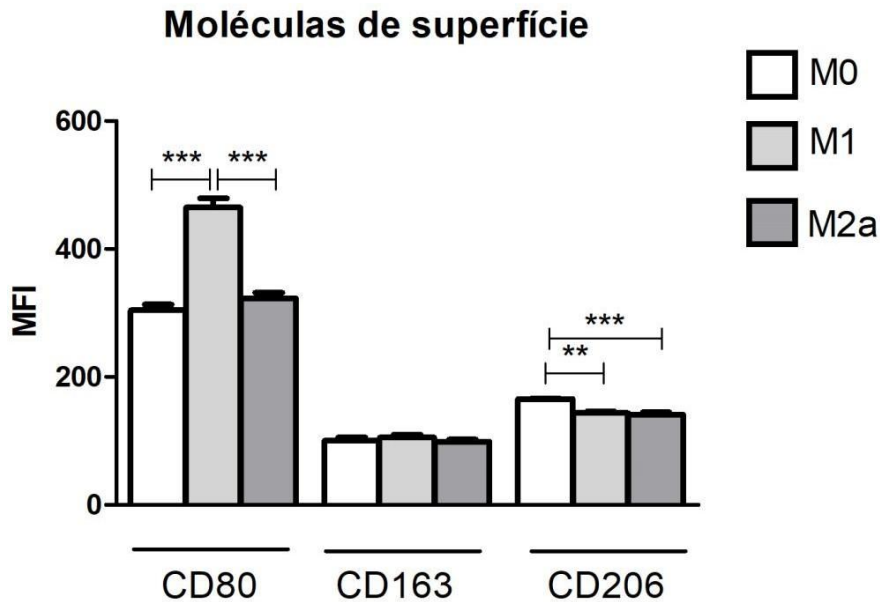


Figura 12. Expressão de moléculas de superfície de macrófagos M0, M1 e M2. Células da linhagem THP-1 foram incubadas com PMA por 48 horas e posteriormente foram estimuladas com RPMI +10% SBF para M0 (macrófagos não polarizados); 30 ng/ml de IFN- γ + 100 ng/ml de LPS para polarização em M1. Após 3 dias de incubação com as citocinas recombinantes, as células foram submetidas ao ensaio de citometria de fluxo. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA, com pós teste de Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$).

5.2.2. Extrato bruto de *Piper tuberculatum* induz aumento da porcentagem de macrófagos M1 que expressam CD163, TLR4, CD40 e HLA-DR.

Visando avaliar os possíveis efeitos das substâncias bioativas em células previamente ativadas para o estado pró-inflamatório, incubamos macrófagos polarizados em M1 na presença do EBEOH de *P. tuberculatum*, FAcOEt e piplartina - uma substância isolada dessa espécie e rutina - uma substância isolada utilizada comercialmente.

Após 24 horas de incubação com o EBEOH, observamos aumento da

porcentagem de células positivas para CD163, TLR4, CD40 e HLA-DR em relação ao total de macrófagos M1 CD14⁺ da cultura controle (CC) (Figura 13).

Além disso, foi possível observar diminuição da porcentagem de células que expressam CD40 quando incubadas com rutina em relação ao total de macrófagos M1 CD14⁺ da cultura controle (CC) (Figura 13).

Macrófagos M1

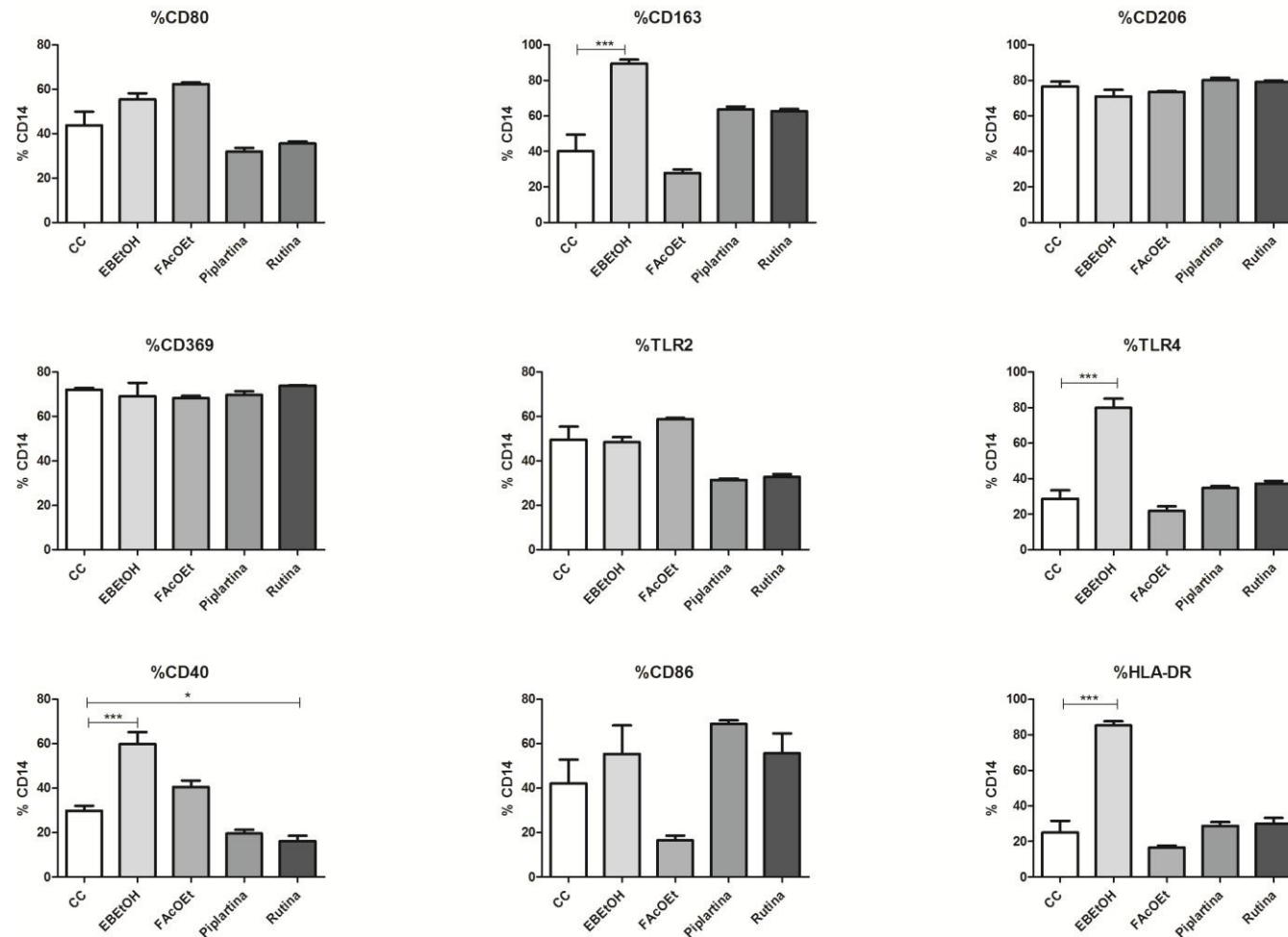


Figura 13. Distribuição de moléculas de superfície em macrófagos M1. Macrófagos foram estimulados durante 24 horas com substância bioativas vegetais. Resultados da citometria de fluxo expressos em média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA, com pós teste de Dunnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$; CC = Cultura Controle; EBEtOH= Extrato Bruto; FAcOEt = Fração acetato).

5.1.3. Substâncias bioativas de *Piper tuberculatum* alteram a expressão de moléculas de superfície de macrófagos M1.

Posteriormente, avaliamos a intensidade de fluorescência das diferentes moléculas de superfície propostas. Verificamos que após as células serem estimuladas com EBEtOH, FAcOEt e piplartina por 24 horas, macrófagos M1 apresentam um aumento da expressão de moléculas de superfície chave do processo inflamatório. Foi possível observar que o EBEtOH induz aumento da expressão de CD163 e TLR4 em relação aos macrófagos M1 da cultura controle (não estimulados). Enquanto que a FAcOEt por sua vez, induziu aumento da expressão de CD86 e HLA-DR e diminuição da expressão de CD206, em relação à cultura controle. Ao submetermos as células a piplartina verificamos que esta induziu aumento significativo de TLR2 e TLR4, enquanto que a rutina induziu somente o aumento na expressão de CD40 (Figura 14).

Os histogramas de contagem e expressão dos receptores estão representados na figura 15, 16 e 17.

Macrófagos M1

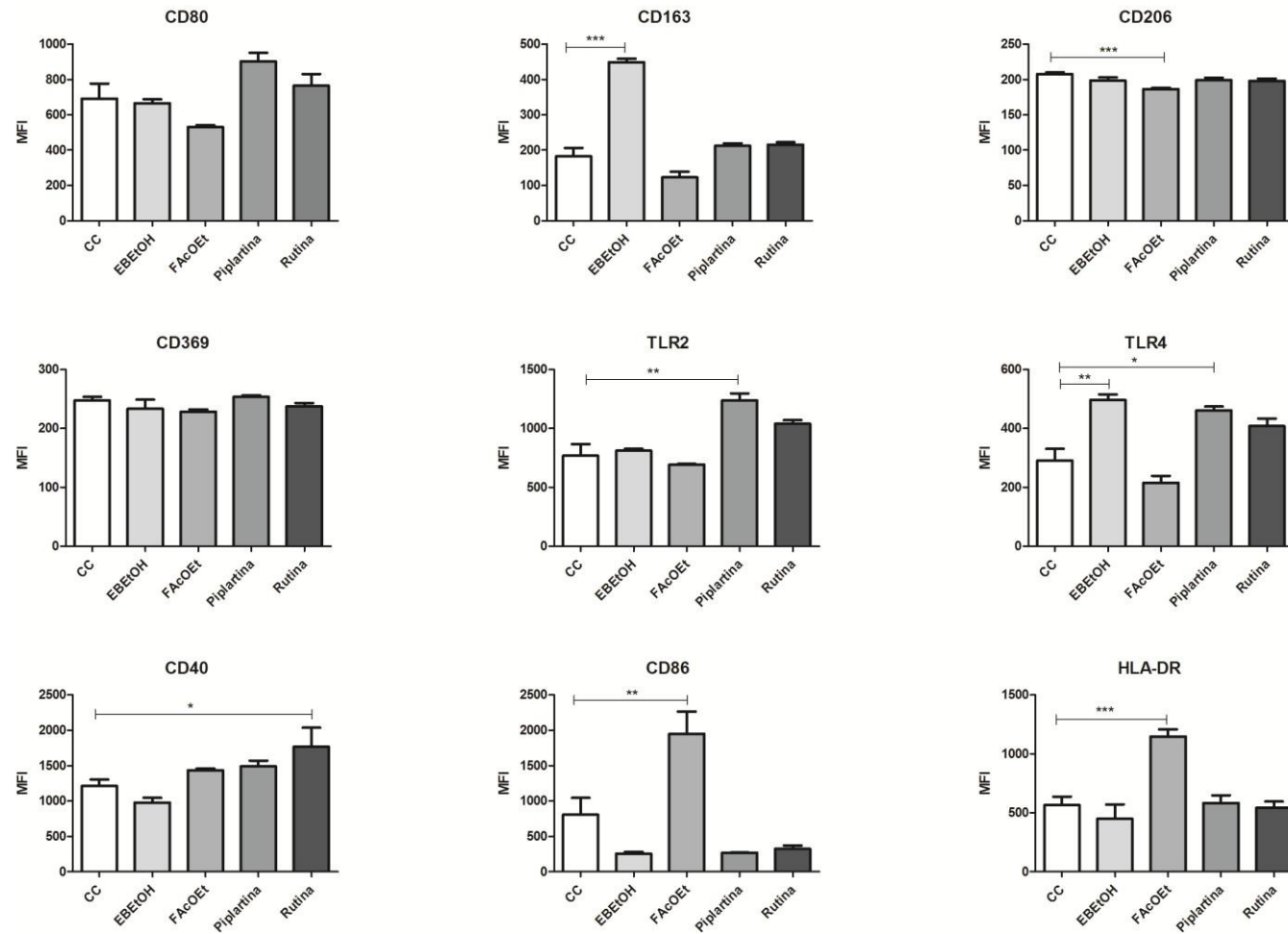


Figura 14. Expressão de moléculas de superfície de macrófagos M1. Macrófagos foram estimulados durante 24 horas com substâncias bioativas vegetais. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste ANOVA, com pós teste de Dunnet (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 3$; CC = Cultura Controle; EBEtOH= Extrato Bruto; FAcOEt = Fração acetato).

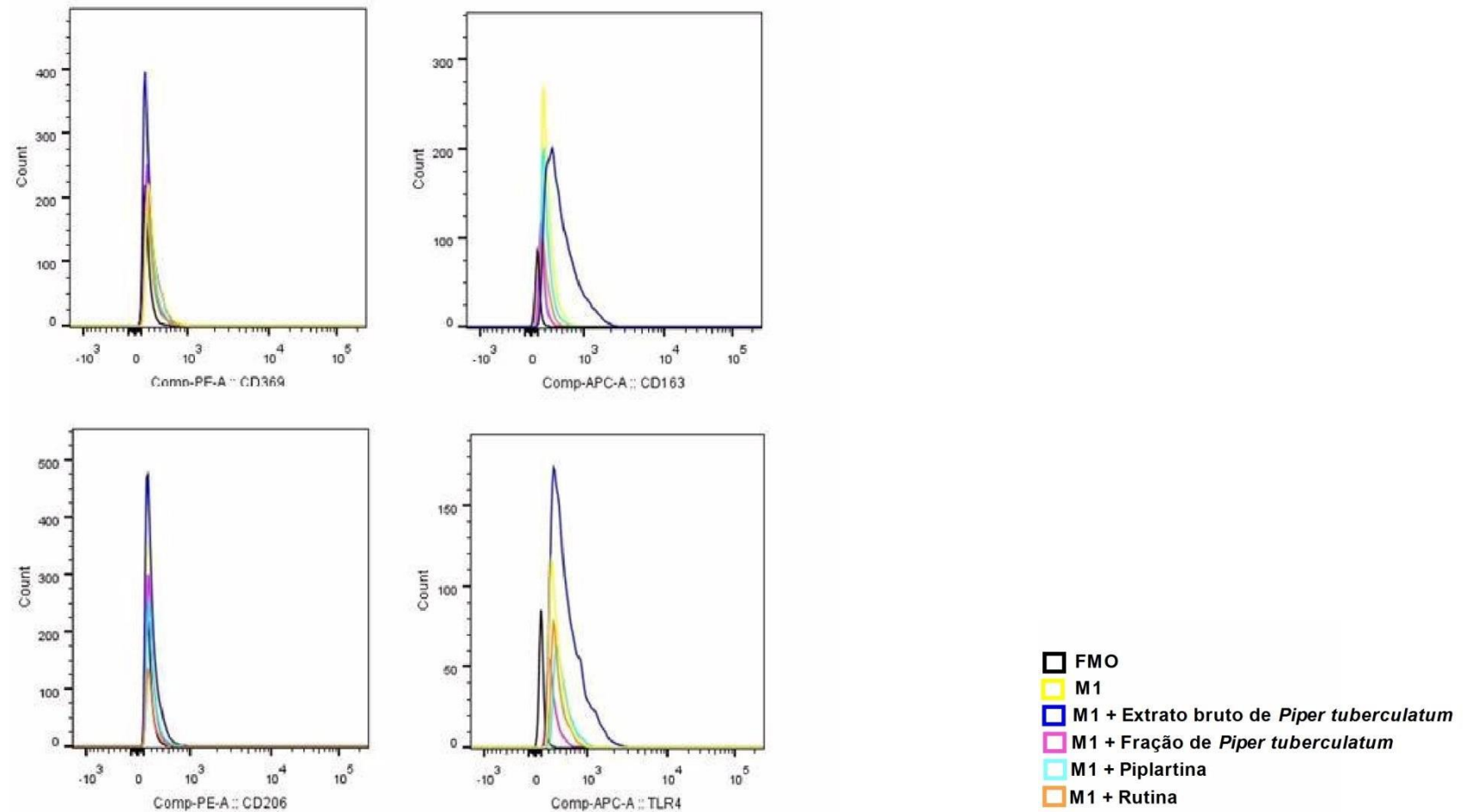


Figura 15. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície de macrófagos M1 estimulados com substâncias bioativas.

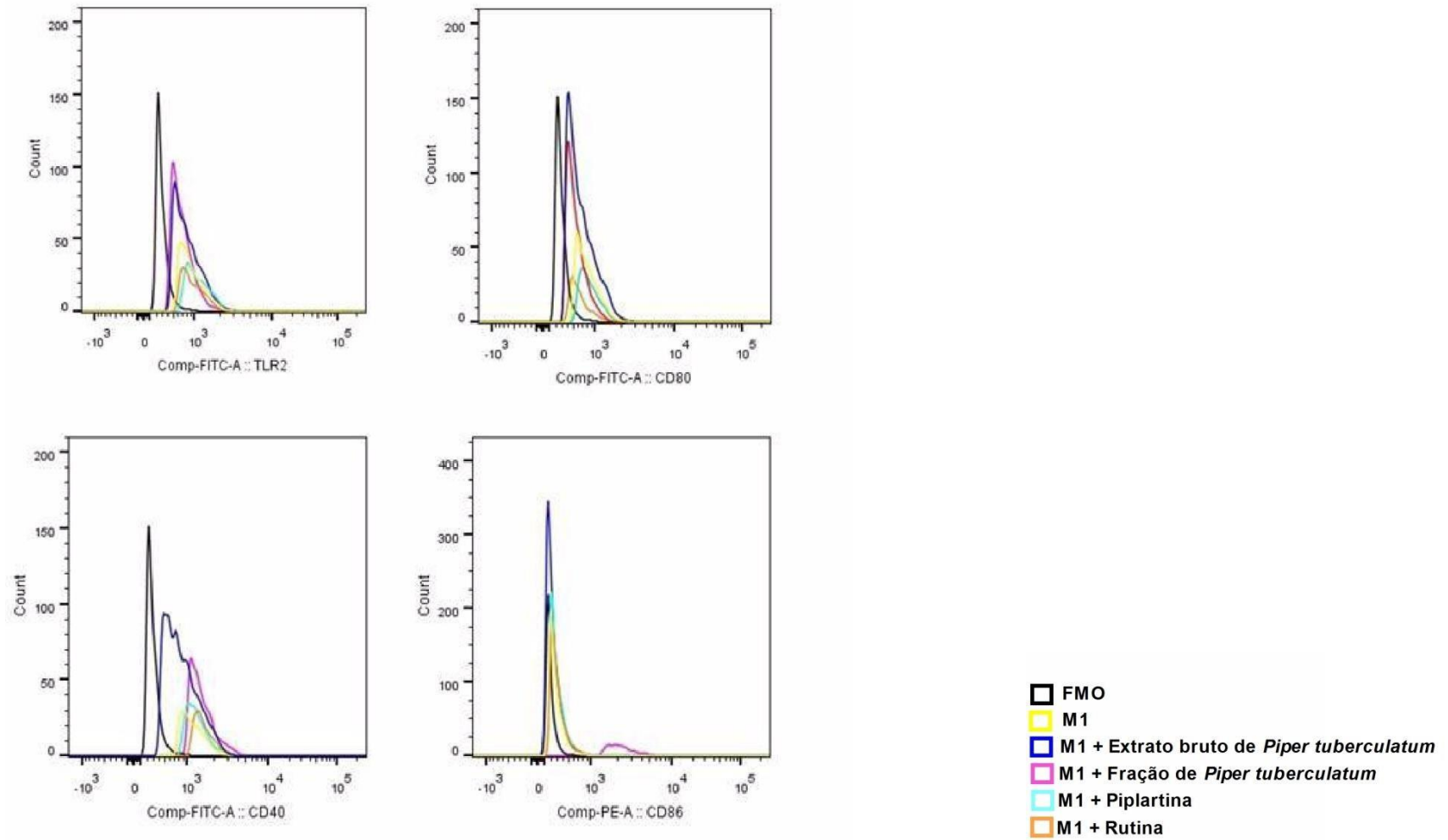


Figura 16. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície de macrófagos M1 estimulados com substâncias bioativas.

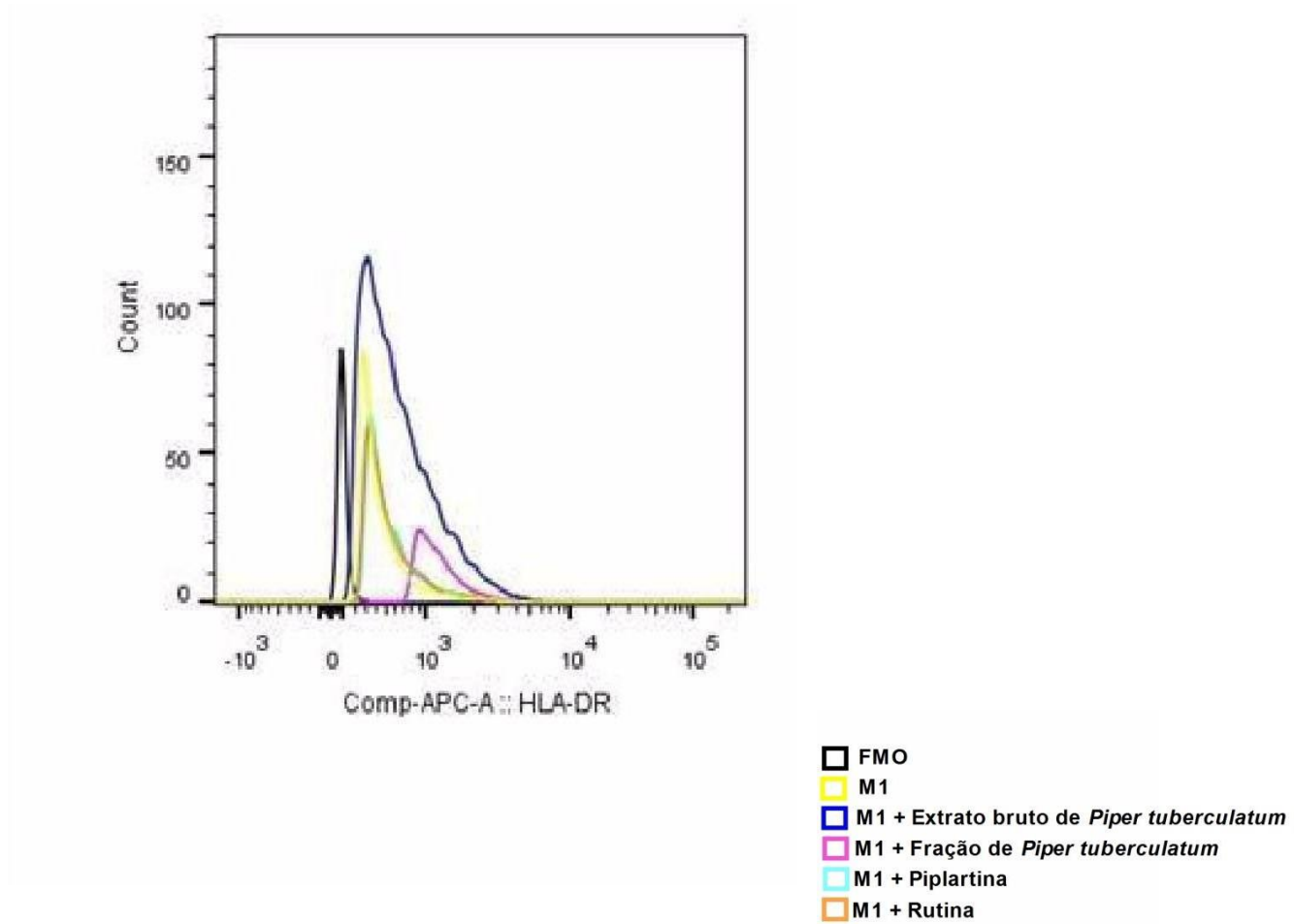


Figura 17. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície de macrófagos M1 estimulados com substâncias bioativas.

5.2. DISCUSSÃO

Em nossos resultados de tratamento de macrófagos M1 com os extratos, verificamos que EBEtOh de *P. tuberculatum* aumentou a porcentagem de células que expressam CD163, TLR4, CD40 e HLA-DR quando comparadas com a cultura controle. Além disso, o extrato promoveu o aumento da intensidade de expressão das moléculas CD163 e TLR4. Esses resultados em conjunto, sugerem que o EBEtOh em macrófagos M1 proporcionou um aumento da capacidade de reconhecimento de patógenos, aumentando a expressão de moléculas chave envolvidas no reconhecimento de patógenos e desenvolvimento da resposta imune. Apesar de a CD163 ser um dos principais marcadores da ativação alternativa macrofágica para M2 (Etzerodt e Moestrup, 2013) e com importante papel na resposta anti-inflamatória, este receptor assim como os receptores TLRs, pode estar envolvido no reconhecimento de certos patógenos. Como por exemplo, na resposta contra o *Staphylococcus aureus*, que acaba se ligando a CD163 solúvel via peptídeos de fibronectina, causando o reconhecimento, fagocitose e morte da bactéria pelos macrófagos (Kneidl *et al.*, 2012). Além disso, a CD163 pode representar um interessante alvo terapêutico, uma vez que quando conjugada à drogas anti-inflamatórias, como dexametosona, promove uma eficácia 50 vezes maior do que somente a droga, devido sua capacidade de mediar a endocitose e transporte da droga para dentro da célula (Graversen *et al.*, 2012).

Quando avaliamos os efeitos da FAcOEt de *P. tuberculatum* verificamos que o extrato aumentou a intensidade de expressão de CD86 e HLA-DR, e diminuiu a expressão de CD206, comparada com a cultura controle. A CD86 é uma molécula co-estimulatória expressa em células apresentadoras de antígenos que fornece sinais necessários para a ativação de linfócitos T. O aumento de expressão tanto do

CD86 como de HLA-DR é interessante, uma vez que as duas moléculas são importantes para a ativação completa dos linfócitos T, de modo que na ausência de sinais co-estimulatórios os linfócitos podem ficar anérgicos (Takizawa *et al.*, 2007). Além disso, a diminuição na expressão de marcadores específicos de M2 como o CD206 reforça a modulação da resposta macrofágica para o perfil pró-inflamatório.

A grande diversidade de classes e compostos químicos encontrados na *P. tuberculatum*, vem se destacando no cenário científico. Dentre estes compostos, destacam-se a amida piplartina. Em nossos resultados, a presença da piplartina gerou aumento da expressão de TLR2 e TLR4 em macrófagos M1 quando comparados com a cultura controle. Os receptores TLRs estão diretamente relacionados à imunidade inata e adaptativa por possuir a capacidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) e desencadear o início da resposta imune (Savva e Roger, 2013). O TLR2, por exemplo, em associação com TLR1 e 6 é capaz de detectar uma variedade de produtos microbianos como lipopeptídeos, lipoproteínas, peptidoglicano, β -glucana, e outros compostos presentes em fungos, bactérias, micobactérias, parasitas e vírus (Savva e Roger, 2013; Oliveira *et al.*, 2019). Já o TLR4 é capaz de reconhecer o LPS presente na membrana de bactérias Gram negativas (Kuzmich *et al.*, 2017). Corroborando com nossos dados, na literatura há trabalhos que evidenciam o papel da piplartina contra parasitas (Rapado *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2011) e fungos (Navickiene *et al.*, 2000, 2003; Vasques *et al.*, 2002; Bezerra *et al.*). Dessa forma, reforçando seu papel na ativação da resposta imune contra patógenos.

Como controle de ação anti-inflamatória, utilizamos a rutina em macrófagos M1. A rutina é um flavonóide intensamente estudado por se tratar de um composto alvo para a indústria farmacêutica. (Pedriali, 2005). Ela pode ser encontrada em diversos alimentos como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs,

tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (Becho et al., 2009). No Brasil, a rutina é extraída e comercializada a partir de frutos de *Dimorphandra mollis* Benth, espécie arbórea, pertencente à família Caesalpinaceae, encontrada nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Para, São Paulo, e na Caatinga Nordestina (Chaves e Usberti, 2003; Becho et al., 2009). Na literatura, estudos discutem o potencial da rutina em suprimir a imunidade celular (Middleton et al., 2000; Han, 2009) e apresentar atividade anti-inflamatória (Guardia et al., 2001) e anti-microbiana (Pereira et al., 2007).

Em nossos resultados observamos que macrófagos M1 quando estimulados com rutina apresentaram diminuição da porcentagem de células CD40⁺, porém, as que apresentavam o receptor exibiram aumento da intensidade de expressão quando comparada a cultura controle. A CD40 é uma molécula transmembrana, expressa em macrófagos, linfócitos T, plaquetas, células endoteliais e células musculares lisas (Francisco, 2006 ; Volp et al, 2008) e considerada um marcador inflamatório. Acreditamos que a rutina em nossos experimentos modulou a expressão de CD40 nos macrófagos previamente estimulados para perfil pró-inflamatório, diminuindo a porcentagem de células que expressavam a molécula, o que poderia ser um indício de uma regulação da resposta imune, evitando uma resposta pró-inflamatória exacerbada. Porém, ao mesmo tempo, aumentou a expressão de CD40 na porcentagem restante de células que ainda apresentavam a molécula, não inibindo o desencadeamento da resposta imune.

Em relação a modulação dos macrófagos M1, nossos resultados se mostraram promissores e demonstraram uma possível atuação das substâncias bioativas no aumento de moléculas importantes no reconhecimento de patógenos e desenvolvimento da resposta imune, como CD40, e TLR-2 e 4.

6. CONCLUSÃO:

Em conjunto, nossos resultados evidenciaram o potencial imunomodulador das substâncias bioativas provenientes da *Piper tuberculatum*, com um destaque para a substância isolada, Piplartina, seja na modulação do inflamassoma, inibindo a produção da IL-1 β ou na modulação dos macrófagos M1, aumentando a expressão de moléculas importantes no reconhecimento de patógenos e desenvolvimento da resposta imune, como CD40, e TLR-2 e TLR-4.

7. REFERÊNCIAS

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latgé JP.(2009) Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*; 2009; **460**:1117–1121.

Amorim et al., Enhanced expression of NLRP3 inflammasome components by monocytes of patients with pulmonary paracoccidioidomycosis is associated with smoking and intracellular hypoxemia, *Microbes and Infection*, <https://doi.org/10.1016/>

Amorim, CZ, Flores, CA, Gomes, BE, Marques, AD, Cordeiro RS,. Screening for antimalarial activity in the genus *Potomophe*. *J Ethnopharmacol*. 1988;24, 101–106.

Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;72(1):101–6.

Apel, MA., Sobral, M., Schapoval, EES., Henriques, AT., Menut, C., Bessiere, JM. Essential Oils from *Eugenia* Species—Part VII: Sections *Phyllocalyx* and *Stenocalyx*. *Journal of Essential Oil Research*. 2004; 16:135–138. doi:10.1080/10412905.2004.9698675

Aravind, L, Dixit, VM, Koonin, EV. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*. 2001; 291:1279–1284. doi:10.1126/science.291.5507.1279

Aristizabal, BH.; Clemons, KV.; Cock, AM.; Restrepo, A.; Stevens, DA.(2002) Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: Influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Medical Mycology*. 2002; 40:169-178.

Aristizabal, BH.; Clemons, KV.; Stevens, DA.; Restrepo, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infection and Immunity*. 1998; 66:5587-5591.

Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018; 223(4):383–96.

Bachiega TF, Dias-Melicio LA, Fernandes RK, de Almeida Balderramas H, Rodrigues DR, Ximenes VF, de Campos Soares ÂM. *Participation of dectin-1 receptor on NETs release against Paracoccidioides brasiliensis*: Role on extracellular killing. *Immunobiology*. 2016 ;221(2):228-35.

Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Barbosa, FH, Montenegro MR.(2003) High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): An ecological study. *Medical Mycology*. 2003; 41(3): 217-22.

Bauernfeind, F., Homung, V. Of inflammasomes and pathogens—sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med*. 2013; 5:814–826. doi:10.1002/emmm.201201771

Beauvais A, et al. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*. 2007; 9:1588–1600.

Becho JRM, Machado H, Guerra MO. RUTINA – ESTRUTURA, METABOLISMO E POTENCIAL FARMACOLÓGICO. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais - Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies [Internet]*. 2009 [citado 15 de outubro de 2019];1(1). Disponível em: <https://periodicos.uff.br/index.php/riee/article/view/23874>

Benard, G., Hong, M.A., Del Negro, G.M., Batista, L., Shikanai-Yasuda, M.A., Duarte, A.J. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 54:7–12.

Bezerra DP, Moura DJ, Rosa RM, de Vasconcellos MC, e Silva ACR, de Moraes MO. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkaloid of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2008; 652(2):164–74.

Biso, FI., Rodrigues, CM., Rinaldo, D., Reis, MB. dos, Bernardi, CC., de Mat os, JCP., Caldeira-de-Araújo, A., Vilegas, W., Cólus, I.M. de S., Varanda, E.A. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). *Mutat. Res.* 2010; 702:92–99. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.07.011

Bolzani V da S, Valli M, Pivatto M, Viegas C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure Appl. Chem.* 2012; 84(9):1837-46. Doi: 10.1351.

Bolzani, V. da S., Valli, M., Pivatto, M., Viegas, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure and Applied Chemistry.* 2012; 84. doi:10.1351/PAC-CON-12-01-11

Burci LM, Pereira IT, Silva LM, Rodrigues RV, Facundo VA, Militão JSLT, et al. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and pipartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. *J Ethnoph.* 2013; 148(1):165-174.

Carlos, IZ., Lopes, FCM., Benzatti, FP., Carli, CBA., Marques, MF., Jordão Junior, CM., Rinaldo, D., Calvo, TR., Santos, LC., Vilegas, W., 2005. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2005; 15. doi:10.1590/S0102-695X2005000100010

Carmo, JPM., Dias-Melicio, LA., Calvi, SA., Peraçoli, MTS., Soares, AMVC. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med. Mycol.* 2006; 44, 363–368.

Cechinel Filho, V., Yunes, R.A. Strategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants: concepts about structural modification for improve the activity. *Química Nova.* 1998; 21:99–105. doi:10.1590/S0100-40421998000100015

Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HFJ, Wichers HJ. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct.* 2013; 4(2):266–76.

Chaves MMF, Usberti R. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). *Brazilian Journal of Botany.* 2003; 26(4):557–64.

Chizzolini C, Rezzonico R, Luca CD, Burger D, Dayer J-M. Th2 Cell Membrane Factors in Association with IL-4 Enhance Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) while Decreasing MMP-9 Production by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Differentiated Human Monocytes. *The Journal of Immunology.* 2000; 164(11):5952–60.

Cotinguiba, F., Regasini, LO., Bolzani, V. da S., Debonsi, HM., Passerini, GD., Cicarelli, RMB., Kato, MJ., Furlan, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Med Chem Res.* 2009; 18:703–711. doi:10.1007/s00044-008-9161-9

De Campos, M.P., Cechinel Filho, V., Da Silva, R.Z., Yunes, R.A., Zacchino, S., Juarez, S., Bella Cruz, R.C., Bella Cruz, A., 2005. Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Biol. Pharm. Bull.* 2005;28:1527–1530.

de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, de Blotta MHSL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013; 67:470e85.

de Castro LF, Longhi LNA, Paiao MR, da Justo-Júnior AS, de Jesus MB, de Blotta MHSL, et al. NLRP3 inflammasome is involved in the recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* by human dendritic cells and in the induction of Th17 cells. *J Infect.* 2018;77:137e44.

de Ferreira-da-Cruz, M., Adami, Y.L., da Espinola-Mendes, E., Figueiredo, M.R., Daniel-Ribeiro, C.T., 2000. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiparasitic activity in the Pothomorphe plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. *Exp. Parasitol.* 2000; 94:243–247. doi:10.1006/expr.2000.4494

Della Coletta AM, Bachiega TF, de Quaglia e Silva JC, Soares ÂM, De Faveri J, Marques SA, Marques ME, Ximenes VF, Dias-Melicio LA. Neutrophil Extracellular Traps Identification in Tegumentary Lesions of Patients with Paracoccidioidomycosis and Different Patterns of NETs Generation In Vitro. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 1;9(9)

Dierichs L, Kloubert V, Rink L. Cellular zinc homeostasis modulates polarization of THP-1-derived macrophages. *Eur J Nutr.* 2018; 57(6):2161–9.

Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxid Redox Signal.* 10 de junho de 2013;18(17):2352–63.

Farnsworth, N.R., Kaas, C.J. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. *J Ethnopharmacol.* 1981; 3:85–99.

Ferriotti C., Bazan S.B., Loures F.V., Araújo E.F., Costa T.A., Calich V.L. Expression of dectin-1 and enhanced activation of NALP3 inflammasome are associated with resistance to paracoccidioidomycosis. *Front Microbiol.* 2015; 6:913

Finato AC, Fraga-Silva TF, Prati AUC, de Souza Júnior AA, Mazzeu BF, Felipe LG, et al. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. *PLoS ONE.* 2018. 13(6): e0198682.

Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, Cao H, Wilson HM, Barker RN, et al. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol.* 2018;332:58–76.

Franco, M., Peracoli, M.T., Soares, A., Montenegro, R., Mendes, R.P., Meira, D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol.* 1993; 5:115–149.

Freeman, L.C., Ting, J.P.-Y. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 2016; 136: 29–38. doi:10.1111/jnc.13217

Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest.* dezembro de 1989;84(6):1780–5.

- Gates MA, Thorkildson P, Kozel TR. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol.* 2004; **52**:13–24.
- Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015; **15**:577.
- Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. Piperine—The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medicinal Formulations. *Comp Rev. In Food Sci and Food Saf.* 2017; **16**:124–140.
- Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2012; **10**:112–122.
- Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, et al. Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein β IG-H3. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2001; **53**(4):386–92.
- Graversen JH, Svendsen P, Dagnæs-Hansen F, Dal J, Anton G, Etzerodt A, et al. Targeting the Hemoglobin Scavenger receptor CD163 in Macrophages Highly Increases the Anti-inflammatory Potency of Dexamethasone. *Mol Ther.* agosto de 2012; **20**(8):1550–8.
- Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature.* 2009; **459**: 433–436
- Gross, O., Thomas, C.J., Guarda, G., Tschopp, J., (2011). The inflammasome: an integrated view. *Immunol. Rev.* 2011; **243**, 136–151. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01046.x
- Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol.* 2001; **56**(9):683–7.
- Guo C, et al. Acapsular *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Microbes Infect* 2014; **16**:845–854.
- Guo, H., Callaway, J.B., Ting, J.P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 2015; **21**:677–687. doi:10.1038/nm.3893
- Han Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol.* 2009; **9**(2):207–11.
- Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe.* 2009; **5**: 487–497.
- Inohara, N., Nuñez, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; **3**: 371–382. doi:10.1038/nri1086
- Joly S, Ma N, Sadler JJ, Soll DR, Cassel SL, et al. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol.* 2009; **183**: 3578–3581
- Joosten LA, et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 β . *Arthritis Rheum.* 2009; **60**:3651–3662.
- Juvenale, M., Del Negro, G.M., Duarte, A.J., Benard, G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. *J. Med. Microbiol.* 2001; **50**:127–134.

- Kankkunen P, Teirila L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol.* 2010; **184**:6335–6342.
- Ketelut-Cameiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, Silva JS.(2015) IL-18 triggered by the Nlrp3 inflammasome induces host innate resistance in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol.* 2015 ;194(9):4507-17.
- Kneidl J, Löffler B, Erat MC, Kalinka J, Peters G, Roth J, et al. Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific fibronectin peptides. *Cellular Microbiology.* 2012;14(6):914–36.
- Kumar H, et al. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *J Immunol.* 2009; **183**:8061–8067.
- Kushima, H., Nishijima, C.M., Rodrigues, C.M., Rinaldo, D., Sassá, M.F., Bauab, T.M., Stasi, L.C.D., Carlos, I.Z., Brito, A.R.M.S., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., 2009. Davilla elliptica and Davilla nitida: gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-Helicobacter pylori action. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123:430–438. doi:10.1016/j.jep.2009.03.031
- Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines.* 2017 [citado 15 de outubro de 2019];5(4). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748601/>
- Lago, J.H.G., Tanizaki, T.M., Young, M.C.M., Guimarães, E.F., Kato, M.J. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 2005; 16:153–156. doi:10.1590/S0103-50532005000200005
- Lamkanfi M, Malireddi RK, Kanneganti TD. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem.* 2009; **284**:20574–20581.
- Lei G, Chen M, Li H, Niu JL, Wu S. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell Res.* 2013; 23:965–968
- Lei G, et al. Biofilm from a clinical strain of *Cryptococcus neoformans* activates the NLRP3 inflammasome. *Cell Res.* 2013; **23**:965–968.
- Leu WJ, Chen JC, Guh JH. Extract From *Plectranthus amboinicus* Inhibit Maturation and Release of Interleukin 1 β Through Inhibition of NF- κ B Nuclear Translocation and NLRP3 Inflammasome Activation. *Front Pharmacol.* 2019;10:573. Published 2019 May 28. doi:10.3389/fphar.2019.00573
- López, S.N., Lopes, A.A., Batista, J.M., Flausino, O., Bolzani, V. da S., Kato, M.J., Furlan, M. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). *Bioresour. Technol.* 2010; 101:4251–4260. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.041
- Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brasil Med.* 1908; 22:121–124.

- Mamoni, R.L., Blotta, M.H.S.L. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2006; 35:207–216.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004; 25(12):677–86.
- Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015; 19:11-20.
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell*. 2002; 10:417–426.
- Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol*. 2009; 27: 229–265. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715
- Martinon, F., Tschopp, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005; 26:447–454. doi:10.1016/j.it.2005.06.004
- Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2015; 23(1):65-73.
- McCoy, S.S., Stannard, J., Kahlenberg, J.M. Targeting the inflammasome in rheumatic diseases. *Transl Res*. 2016; 167, 125–137. doi:10.1016/j.trsl.2015.06.006
- McFadden DC, Casadevall A. Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol*. 2001; 39(Suppl 1):19–30.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002; 296, 298–300. doi:10.1126/science.1068883
- Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017; 22:224e82.
- Michelin, D.C., Iha, S.M., Rinaldo, D., Sannomiya, M., Santos, L.C., Vilegas, W., Salgado, H.R.N., 2005. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2005; 15:209–211. doi:10.1590/S0102-695X2005000300008
- Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(4):673–751.
- Montellano, B. de. Empirical Aztec medicine. *Science*. 1975; 188:15-220. doi:10.1126/science.1090996
- Moraes J de, Nascimento C, Lopes POMV, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. *Experimental Parasitology*. 1^o de fevereiro de 2011; 127(2):357–64.
- Moraes J, Nascimento C, Lopes POMV, Nakano E, Yamaguchi LF, Kato MJ, et al. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. *Exper. Parasitology*. 2011; 127(2):357-364.
- Moreira F, Riul T, Moreira M, Pilon A, Dias-Barufi M, Araújo M, et al. Leishmanicidal Effects of

Piperlongumine (Piplartine) and Its Putative Metabolites. *Planta Medica*. 2018; doi:10.1055/a-0614-2680

Morelle W, Bernard M, Debeaupuis JP, Buitrago M, Tabouret M, Latge JP. Galactomannoproteins of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005; 4:1308–1316.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(12):958–69.

Mota, N.G., Peraçoli, M.T., Mendes, R.P., Gat ass, C.R., Marques, S.A., Soares, A.M., Izatto, I.C., Rezkallah-Iwasso, M.T.(1988). Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol*. 1988; 26:105–111.

Mota, N.G., Rezkallah-Iwasso, M.T., Peraçoli, M.T., Audi, R.C., Mendes, R.P., Marcondes, J., Marques, S.A., Dillon, N.L., Franco, M.F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 1985; 79:765–772.

Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere*. 2016; 1(5):e00213-16.

Navickiene HM, Alécio AC, Kato MJ, Bolzani VD, Young MC, Cavalheiro AJ, et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 2000; 55(6):621–6.

Navickiene HMD, Bolzani V da S, Kato MJ, Pereira AMS, Bertoni BW, França SC, et al. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal*. 2003;14(5):281–4.

Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol*. 2012 [citado 15 de outubro de 2019];3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342043/>

Park M-J, Lee D-E, Shim MK, Jang EH, Lee JK, Jeong SY. Piperlongumine inhibits TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition by modulating the expression of E-cadherin, Snail1, and Twist1. *European Journal of Pharmacology*. 2017. Doi: 10.1016.

Pedriali, AC. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes [Dissertação de Mestrado]. [Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica]: Universidade de São Paulo; 2005.

Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, et al. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*. 26 de maio de 2007;12(5):1153–62.

Ramm GA, Nair VG, Bridle KR, Shepherd RW, Crawford DHG. Contribution of Hepatic Parenchymal and Nonparenchymal Cells to Hepatic Fibrogenesis in Biliary Atresia. *Am J Pathol*. agosto de 1998;153(2):527–35.

Rapado LN, Pinheiro A de S, Lopes PO de MV, Fokoue HH, Scotti MT, Marques JV, et al.

Schistosomiasis Control Using Piplartine against *Biomphalaria glabrata* at Different Developmental Stages. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 6 de junho de 2013 [citado 15 de outubro de 2019];7(6). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3675008/>

Rinaldo, D., Silva, M.A., Rodrigues, C.M., Calvo, T.R., Sannomiya, M., Santos, L.C. dos, Vilegas, W., Kushima, H., Hiruma-Lima, C.A., Brito, A.R.M. de S. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. By high-speed counter-current chromatography. *Química Nova*. 2006; 29:947–949. doi:10.1590/S0100-40422006000500011

Rodrigues, C.M., 2007. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho,” Araraquara.

Rodrigues, C.M., Rinaldo, D., Sannomiya, M., dos Santos, L.C., Montoro, P., Piacente, S., Pizza, C., Vilegas, W. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. *Phytochem Anal*. 2008; 19:17–24. doi:10.1002/pca.1008

Said-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM (2010) *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS one* 5: e10008.

Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front Immunol*. 2013; 4:387.

Schett, G., Dayer, J.-M., Manger, B., (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12:14–24. doi:10.1038/nrrheum.2016.166

Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, et al. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Molecular Immunology*. 2017; 88:58–68.

Spiller KL, Wrona EA, Romero-Torres S, Pallotta I, Graney PL, Witherell CE, et al. Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Experimental Cell Research*. 2016; 347(1):1–13.

Stasi, L.C. di, 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica, 2a. ed., e ampliada. ed. Editora UNESP, São Paulo, SP

Stossi F, Madak-Erdoğan Z, Katzenellenbogen BS. Macrophage-elicited loss of estrogen receptor- α in breast cancer cells via involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1 genomic locus. *Oncogene*. 2012;31(14):1825–34.

Takizawa R, Pawankar R, Yamagishi S, Takenaka H, Yagi T. Increased expression of HLA-DR and CD86 in nasal epithelial cells in allergic rhinitis: antigen presentation to T cells and up-regulation by diesel exhaust particles. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37(3):420–33.

Tavares AH, Magalhaes KG, Almeida RD, Correa R, Burgel PH, Bocca AL. NLRP3 inflammasome activation by *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7:e2595.

Tedesco S, De Majo F, Kim J, Trenti A, Trevisi L, Fadini GP, et al. Convenience versus Biological

Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front Pharmacol.* 2018; 9:71.

Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. *PLoS Pathog.* 2014;

Tschopp, J., Martinon, F., Burns, K.. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4, 95–104. doi:10.1038/nm1019

Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. *Fungal Genet Biol.* 2017; 106:9–25.

Unander, D.W., Webster, G.L., Blumberg, B.S. Usage and bioassays in Phyllanthus (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. *J Ethnopharmacol.* 1995; 45:1–18

van de Veerdonk FL, et al. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur J Immunol.* 2011; 41:2260–2268.

van de Veerdonk, F.L., Netea, M.G., Dinarello, C.A., Joosten, L.A.B., (2011). Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011; 32:110–116. doi:10.1016/j.it.2011.01.003

Vasques da Silva R, Debonsi Navickiene HM, Kato MJ, Bolzani V da S, Méda CI, Young MCM, et al. Antifungal amides from Piper arboreum and Pipertuberculatum. *Phytochemistry.* 2002; 59(5):521–7.

Venturini J, Cavalcante R, de Assis Golim M, Marchetti C, de Azevedo P, Amorim BC. Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:552

Vizzotto M, Krolow ACR, Weber GEB. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. ISSN 1516-8840, documento 316. 2010

Volp ACP, Alfenas R de CG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2008; 52(3):537–49.

Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30(3):245–57.

Yamaguchi, L.F., Lago, J.H.G., Tanizaki, T.M., Mascio, P.D., Kato, M.J., 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry.* 2006; 67:1838–1843. doi:10.1016/j.phytochem.2006.03.001

Ying X, Chen X, Cheng S, Shen Y, Peng L, Xu HZ. Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. *Int Immunopharmacol.* 2013; 17(2):293–299. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.025

