

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG/UNICENTRO

NATHALIA GUTIERREZ BORCEZI EDIN

EFEITOS DA HISTIDINA EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM LPS

PONTA GROSSA

2025

NATHALIA GUTIERREZ BORCEZI EDIN

EFEITOS DA HISTIDINA EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM LPS

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa em Associação Ampla com Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNIOESTE).

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.
Co-orientador: Prof. Dr. Felipe de Lara Janz.

PONTA GROSSA

2025

E23 Edin, Nathalia Gutierrez Borcezi
Efeitos da Histidina em Macrófagos tratados com LPS / Nathalia Gutierrez Borcezi Edin. Ponta Grossa - Paraná, 2025.
44 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.
Coorientador: Prof. Dr. Felipe de Lara Janz.

1. Macrófagos. 2. Inflamação. 3. Micróglia. 4. Anti-inflamatório. I. Favero, Giovani Marino. II. Janz, Felipe de Lara. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615

NATHALIA GUTIERREZ BORCEZI EDIN

EFEITOS DA HISTIDINA EM MACRÓFAGOS TRATADOS COM LPS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível Mestrado e Doutorado, Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e a Universidade do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Ponta Grossa, 12 de março de 2025.



Prof. Dr. Giovani Marino Favero – UEPG – Presidente



Prof. Dr. Mauro Ricetti Paes – UNICESUMAR – Membro titular externo



Prof. Dr. José Fabiano Costa Justus – UEPG – Membro titular interno

A DEUS,

***E ao meu marido Wagner Weiber,
pelo encorajamento, pela força,
pelos consolos e pelo auxílio em
todos os momentos.***

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Giovani Marino Favero**, pela orientação e pela oportunidade.

Ao professor **Dr. Felipe de Lara Janz**, pela coorientação, por sua prontidão e boa vontade.

À professora **Dra. Carla Cristine Kanunfre**, pelos ensinamentos, pela parceria, pela gentileza e auxílio.

Ao **Marcelo Paulo Bueno da Silva**, pelos ensinamentos sobre cultivos e pela amizade.

À mestre **Laura Verde**, pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

À **Luciane Mendes Monteiro, responsável técnica do Labmu**, pelo auxílio no experimento com o MTT e cuidado dos materiais congelados.

À professora **Dra. Andressa Novatski** pela parceria nos experimentos com a Espectroscopia de Raman.

Ao **Silvio Gonsalves, responsável técnico do C-Labmu**, pelo apoio nos experimentos com a Espectroscopia de Raman.

Aos membros da **banca de qualificação Dr. Marcelo Ferro e Dra. Priscileila Ferrari** pela disponibilidade, pelas instruções e pelo aceite.

Aos membros da **banca de defesa final Dr. Mauro Ricetti Paes e Dr. José Fabiano Costa Justus** pela disponibilidade e pelo aceite.

Ao meu marido **Wagner Weiber**, por todo o apoio, encorajamento e companherismo em todos os momentos.

Aos **meus familiares** por acreditarem em mim e me encorajarem a não desistir.

As demais pessoas que de alguma forma contribuíram com esse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*Ele será o firme fundamento nos tempos a que
você pertence, uma grande riqueza
de salvação, sabedoria e conhecimento;
o temor do SENHOR é a chave desse tesouro.*

Isaías 33:6

RESUMO

Estudos recentes sugerem que a histidina, um aminoácido essencial, contribui para a modulação da resposta imune por meio de sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória atuante em células como os macrófagos. Na imunidade do sistema nervoso central, os macrófagos denominados de micróglia desempenham um papel protetivo essencial em quadros de neuroinflamação como na Doença de Parkinson e na Doença de Alzheimer. Um ativador de macrófagos é o LPS (Lipopolissacarídeo) é uma endotoxina presente na membrana externa de bactérias gram negativas. A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela disfunção sináptica e morte neuronal. Baseado nesta premissa, este trabalho objetivou explorar os efeitos imunomoduladores da histidina em cultivos celulares de macrófagos ativados com LPS e, assim, identificar novas possibilidades terapêuticas para atenuar a inflamação neuronal. Desta forma, a utilização de histidina poderia reduzir a inflamação da micróglia, modulando a resposta imunológica e, até mesmo, retardando a degeneração neuronal associada à patologias neuroinflamatórias. Para tanto, foi utilizada uma linhagem comercial de macrófagos cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Nestas células foram testadas diferentes concentrações de LPS para avaliação da viabilidade celular via ensaio de MTT, a fim de padronizar a melhor dosagem para testes posteriores. Para a análise por Espectroscopia de Raman, as células foram tratadas com diferentes concentrações de histidina. Dos resultados obtidos até então, destaca-se a concentração de 0,001 mg/mL de LPS para ativação dos macrófagos, visto que a ativação celular foi a mais eficaz, sem causar dano às células. A espectroscopia de Raman apresentou que a histidina atua positivamente na resposta pró-inflamatória dos macrófagos. Conclui-se, preliminarmente, que a concentração 0,001 mg/mL de LPS é satisfatória para ativação dos macrófagos sem comprometer as células e que a histidina altera a leitura dos macrófagos, das concentrações testadas a de 1% foi a mais impactante, porém tais concentrações não são ideais como tratamento da Doença de Alzheimer.

Palavras-chave: macrófagos, inflamação, micróglia, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Recent studies suggest that histidine, an essential amino acid, contributes to the modulation of the immune response through its antioxidant and anti-inflammatory capacity in cells such as macrophages. In central nervous system immunity, macrophages known as microglia play an essential protective role in neuroinflammatory conditions such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. One macrophage activator is LPS (Lipopolysaccharide), an endotoxin found in the outer membrane of gram-negative bacteria. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by synaptic dysfunction and neuronal death. Based on this premise, this study aimed to explore the immunomodulatory effects of histidine in cell cultures of macrophages activated with LPS and thus identify new therapeutic possibilities to attenuate neuronal inflammation. In this way, the use of histidine could reduce inflammation in microglia, modulating the immune response and even delaying neuronal degeneration associated with neuroinflammatory pathologies. To this end, we used a commercial strain of macrophages cultured in RPMI medium with 10% SFB and kept in a CO₂ oven at 37°C. Different concentrations of LPS were tested on these cells to assess cell viability via the MTT assay, in order to standardize the best dosage for subsequent tests. For analysis by Raman spectroscopy, the cells were treated with different concentrations of histidine. Of the results obtained so far, the concentration of 0.001 mg/mL of LPS for macrophage activation stands out, since cell activation was the most effective, without causing damage to the cells. Raman spectroscopy showed that histidine acts positively on the pro-inflammatory response of macrophages. It is preliminarily concluded that the 0.001 mg/mL concentration of LPS is satisfactory for activating macrophages without compromising the cells and that histidine alters the macrophage reading, of the concentrations tested, 1% was the most impactful, but such concentrations are not ideal as a treatment for Alzheimer's disease.

Keywords: macrophages, inflammation, microglia, anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- Comparação cérebro saudável com cérebro DA.....	17
FIGURA 2	- A micróglia e a ativação do Alzheimer.....	20
FIGURA 3	- Amostras celulares recém feita e pós incubação.....	23
FIGURA 4	- Campos de macrófagos aglomerados e em processo de multiplicação..	24
FIGURA 5	- Macrófagos J774 vistos na Câmara de Neubauer.....	25
FIGURA 6	- Macro e microscopia do Ensaio de MTT.....	26
FIGURA 7	- Microscopia pela Espectroscopia de Raman.....	27
GRÁFICO 1	- Resultados Viabilidade Celular por MTT.....	29
GRÁFICO 2	- Resultados da análise de Histidina pela Espectroscopia.....	30
GRÁFICO 3	- Resultados da análise de RPMI pela Espectroscopia.....	31
GRÁFICO 4	- Resultados da análise do meio de cultivo pela Espectroscopia.....	32
GRÁFICO 5	- Resultados da análise dos macrófagos pela Espectroscopia.....	33
GRÁFICO 6	- Resultados da análise de HIS 0,25% pela Espectroscopia.....	34
GRÁFICO 7	- Resultados da análise de HIS 0,50% pela Espectroscopia.....	35
GRÁFICO 8	- Resultados da análise de HIS 1% pela Espectroscopia.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI	Alzheimer Disease International
BALB/c	Camundongos
B-ACT	Beta-actina
CD14	Cluster of differentiation 14
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
CTL	Controle
DA	Doença de Alzheimer
DAMPs	Padrões moleculares associados à danos
D-HIS	Dextrógero-histidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ENF	Emaranhados neurofibrilares
EROS	Espécie reativa de oxigênio
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
H ₂ O	Água
HIS	Histidina
IFN-γ	Interferon gama
INOS	Óxido nítrico sintase indutível
IL	Interleucina
J774	Linhagem celular comercial de macrófagos
LBP	Ligante de LPS
L-HIS	Levógero-histidina
HDC	L-histidina descarboxilase
LPS	Lipopolissacarídeo
MHCs	Mecanismos de histocompatibilidade
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MCR	Receptor de Corticosterona
NFKB	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico

OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
RNA	Ácido ribonucleico
RPL32	Proteína Ribossomal L32
RPMI	Meio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)
RRPs	Receptores de reconhecimento padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema nervoso central
TLR-4	Receptor tipo toll-4
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	A HISTIDINA E SUAS CARACTERÍSTICAS	13
2.1.1	Efeitos Benéficos da Histidina	13
2.2	O SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA FORMAÇÃO	14
2.2.1	Diferenciação dos Macrófagos	14
2.3	O LPS – LIPOPOLISSAARÍDEO	15
2.3.1	Mecanismo de Ativação Inflamatória	16
2.3.2	Impactos do LPS no Sistema Nervoso Central	16
2.4	A DOENÇA DE ALZHEIMER – VISÃO GERAL	16
2.4.1	As Alterações Fisiopatológicas Características do Alzheimer	17
2.4.2	Sintomatologia do Alzheimer	18
2.4.3	Formas de Tratamento	18
2.4.4	O Alzheimer e a Micróglia	19
3	OBJEITVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	CULTIVO CELULAR PARA ATIVIDADES EXPERIMENTAIS	23
4.2	CONTAGEM DOS MACRÓFAGOS PARA O PLAQUEAMENTO	24
4.3	PLAQUEAMENTO PARA O TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	25
4.4	PREPARO DOS MACRÓFAGOS PARA O ENSAIO DE MTT	25
4.5	PREPARO PARA ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RAMAN	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	RESULTADOS DO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	28
5.2	RESULTADOS DA ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RAMAN	29
	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A Histidina (HIS) é um aminoácido essencial, ou seja, deve ser consumido na dieta, através de alimentos de origem animal, soja, leguminosas e nozes. Atua em processos fisiológicos por suas interações citoprotetoras (Holeck, 2020). A manipulação dos níveis de histidina tem sido explorada como estratégias terapêuticas para o tratamento de patologias inflamatórias (Li et al., 2020). E é metabolizada pelas células imunes para histamina pela ação (Siqueira et al., 2014).

Os macrófagos específicos do sistema nervoso central (SNC) são a “micróglia”, fazendo parte da imunidade inata. Possui função fagocitária circulante pelo parênquima cerebral, em resposta a neuroinflamação tanto de fase aguda quanto de fase crônica em patologias como a Doença de Alzheimer (Bridlance; Thion, 2023; Heneka et al., 2015; Jevtic et al., 2017; Li et al., 2019; Machado; Carvalho; Rocha Sobrinho, 2020; Madore et al., 2022; Martins, 2018; Minter; Taylor; Crack, 2016; Neher; Neniskyte; Brown, 2012; Yang, 2019).

O LPS (Lipopolissacarídeo) é uma endotoxina localizada na membrana externa de bactérias do tipo gram negativas. Ativa os macrófagos pela ligação à sua proteína ligante de LPS (denominada LBP) e interação com o CD14 (proteína da superfície externa da membrana), é considerado também neurotóxico (Gonçalves, 2017).

A Doença de Alzheimer (DA) por sua vez, é denominada como um distúrbio neurodegenerativo irreversível, sendo a perda progressiva dos neurônios colinérgicos, e um grave problema de saúde no mundial, também é classificada como neuroinflamatória na qual o sistema imune atua (Martins, 2018; Masters et al., 2015, Muszynski et al., 2017; Blennow et al., 2015; Sarlus; Heneka., 2017).

A histidina periférica atua na resposta imune com um modulador neuroinflamatório, tendo um importante papel na micróglia, na homeostase com a regulação do pH e na modulação de LPS, induzindo a síntese de citocinas anti-inflamatórias (Frick et al., 2016).

Porém de acordo com a revisão de literatura não há estudos prévios para conhecermos em quais concentrações a histidina pode modular a resposta imune em modelo de macrófagos *in vitro*, para sabermos a concentração que melhor apresenta benefícios para ser utilizada como um tratamento, como um agente anti-inflamatório em patologias de carácter neurodegenerativo, como o caso da Doença de Alzheimer.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A HISTIDINA E SUAS CARACTERÍSTICAS

A histidina é um aminoácido essencial para os seres humanos, obtido principalmente através de alimentos de origem animal, soja, leguminosas e nozes. Essencial na infância devido às suas propriedades bioquímicas, a histidina existe em duas formas: a L-histidina (L-HIS), que é biologicamente ativa e converte-se em histamina, e a D-histidina (D-HIS) (Berton, 2015; Mahl, 2018).

A L-HIS é catalisada pela enzima L-histidina descarboxilase (HDC), processo iniciado pela expressão da HDC nas células (mastócitos, basófilos e macrófagos) induzido por citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , assim como por produtos microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS) (Siqueira et al., 2014). Em seguida a L-HIS é captada do meio extracelular para o intracelular, onde a HDC atua sobre a histidina, removendo seu grupo carboxila (-COOH) e resultando na formação de histamina e dióxido de carbono (CO₂) como subproduto (Poluha; Grossmann, 2018).

A histamina que por sua vez, é uma amina biogênica que regula processos inflamatórios e a resposta imune, por receptores específicos (H1, H2, H3, H4), modulando funções como secreção gástrica, resposta alérgica e neuroregulação (Parsons; Ganellin, 2006; Siqueira et al., 2014).

2.1.1 Efeitos Benéficos da Histidina

A suplementação com histidina demonstrou efeitos benéficos na regulação do crescimento celular e na proteção contra danos induzidos por estresse oxidativo, auxiliando na modulação da resposta inflamatória (Deng et al., 2021; Li et al., 2020).

Também é relevante para a regulação da síntese de amônia e transurocanato, funcionando como uma enzima citosólica localizada principalmente na pele e no fígado, com uma concentração que varia de 1 a 4 Mm (Brosnan; Brosnan, 2020; Dadová; Galan; Davis, 2018).

2.2 O SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA FORMAÇÃO

A hematopoiese é nome dado ao complexo processo de formação de todas as células sanguíneas, sendo as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) sua base de formação, originando principalmente da medula óssea (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Laurenti; Göttegens, 2018; Orkin; Zon, 2008).

O sistema imune é dividido em imunidade inata, que é constituída por células (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e células dentríticas), tecidos e moléculas e imunidade adaptativa (composta pelas células T e B) (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Chaplin, 2010; Murphy et al., 2016).

2.2.1 Diferenciação dos Macrófagos

Os macrófagos são parte da imunidade inata, da linhagem mieloide, tendo como precursor os monócitos. Atuam por fagocitação de patógenos e de células mortas, importantes na reparação tecidual e em processos fisiopatológicos, sendo diferenciados em M1 e M2 (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Ribeiro, 2021).

Os macrófagos M1 são caracterizados pela produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, que incluem interleucinas e fatores de necrose tumoral. Estes macrófagos desempenham um papel crucial na resistência contra patógenos, com propriedades microbicidas e ativação de respostas imunes do tipo Th1, sua ativação é chamada de clássica (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Ribeiro, 2021).

O fenótipo M1 é induzido pelo LPS, por interferon-gama (IFN- γ) e pelo denominado fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Os M1 secretam citocinas, IL-1 β , TNF (fator de necrose tumoral), IL-12, IL-18 e IL-23, além de atraírem células Th1 por meio das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Delavary et al., 2011; Ginhoux et al., 2016; Lee, 2019; Martinez et al, 2020; Ribeiro, 2021).

Sua expressão fenotípica por sua vez apresenta altos níveis do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), das moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD68. Os M1 a partir da L-arginina ativam a óxido nítrico sintase indutível (iNOS) para a síntese de óxido nítrico (NO). E em patologias, os M1 estão presentes tanto no início quanto na manutenção da inflamação (Abbas; Litchaman;

Pillai, 2022; Ribeiro, 2021).

Os M2 (de ativação alternativa) atuam controlando infecções de parasitas principalmente helmintos e de fungos, são remodeladores teciduais. A indução do fenótipo M2 é provocada pela ativação de infecções fúngicas e/ou parasitárias, complexos imunológicos, células apoptóticas, fator estimulador de colônias de macrófagos (MCSF), e citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Lee, 2019; Ribeiro, 2021).

São subdivididos em quatro subtipos: M2a, M2b, M2c e M2d. Sendo o M2a mediado pelas IL-4, IL-13 ou infecções causadas por fungos e helmintos. O M2b é mediado pelos ligantes do receptor de IL-1, complexos imunes e pelo LPS. O M2c é mediado pelas IL-10, TGF- β e glicocorticoides. E por último M2d é mediado pelas IL-6 e adenosina (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Mantovani et al., 2004; Tamas, 2015; Ribeiro, 2021).

A expressão fenotípica dos M2 é caracterizada pela alta síntese de IL-10, de receptores eliminadores de manose e galactose, e baixos níveis de IL-12, IL-2, IL-23, IL-1 β e caspase-1, além de secretarem quimiocinas do tipo CCL17, CCL22 e CCL24 (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Delavary et al., 2011; Lee, 2019; Ribeiro, 2021).

Para iniciar o processo inflamatório e a defesa, os macrófagos possuem receptores de reconhecimento padrão (RRP) como os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados a dano), esses receptores possibilitam a identificação de substâncias potencialmente patogênicas aos tecidos, alertando as células de defesa que iniciam a resposta imune (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Heneka; Kummer; Latz, 2014; Trudler; Farfara; Frenkel, 2010).

2.3 O LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO

O LPS é uma endotoxina localizada na membrana externa de bactérias gram-negativas. Em pesquisas laboratoriais, o LPS é amplamente utilizado como um agente inflamatório para estudar mecanismos de inflamação e resposta imune (Liu et al., 2022; Kumar et al., 2021; Huang et al., 2020).

Seu papel na indução de processos inflamatórios é bem documentado e envolve uma complexa interação com o sistema imunológico (Liu et al., 2022; Kumar

et al., 2021; Huang et al., 2020; Zhang et al., 2019; Li et al., 2018).

2.3.1 Mecanismo de Ativação Inflamatória

A ativação inflamatória pelo LPS começa com a sua ligação à proteína ligante de LPS (LBP), que facilita a transferência do LPS para o CD14 presente na membrana dos monócitos e macrófagos, uma glicoproteína expressa na superfície de monócitos e macrófagos (Bascones, et al., 2009; Barbeiro, 2009).

Esta interação é crucial para o reconhecimento do LPS e a subsequente ativação da via inflamatória (Bascones, et al., 2009; Kumar et al., 2021; Hayashi; Masaka; Ishikawa, 1999; Huang et al., 2020).

2.3.2 Impactos do LPS no Sistema Nervoso Central

O LPS é utilizado para induzir modelos experimentais de neuroinflamação. A inflamação induzida pode levar à neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos, fazendo com que o LPS seja classificado como uma neurotoxina (Gonçalves, 2017; Huang et al., 2020; Liu et al., 2022).

A ativação da micróglia e a subsequente produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α e interleucinas, desempenham um papel significativo nas doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Parkinson e a Doença de Alzheimer (DA). O LPS, portanto, é uma ferramenta importante para estudar-se os mecanismos ligados à neuroinflamação e para testar a viabilidade de possíveis novos tratamentos (Liu et al., 2022; Huang et al., 2020; Heneka et al., 2013).

2.4 A DOENÇA DE ALZHEIMER

A Doença de Alzheimer é caracterizada pela degradação progressiva das sinapses, tendo seu início no hipocampo e progredindo para as regiões laterais e parietais, iniciando os sinais e levando a morte do córtex cerebral (Martins, 2018; Sumsuzzman et al., 2022; Alzheimer's Disease International, 2022).

De acordo com a Alzheimer Disease International (ADI), atualmente há mais de 55 milhões de indivíduos afetados, tornando o Alzheimer a causa de demência mais

comum, acredita-se que tal estatística duplicará em 20 anos (ADI, 2022).

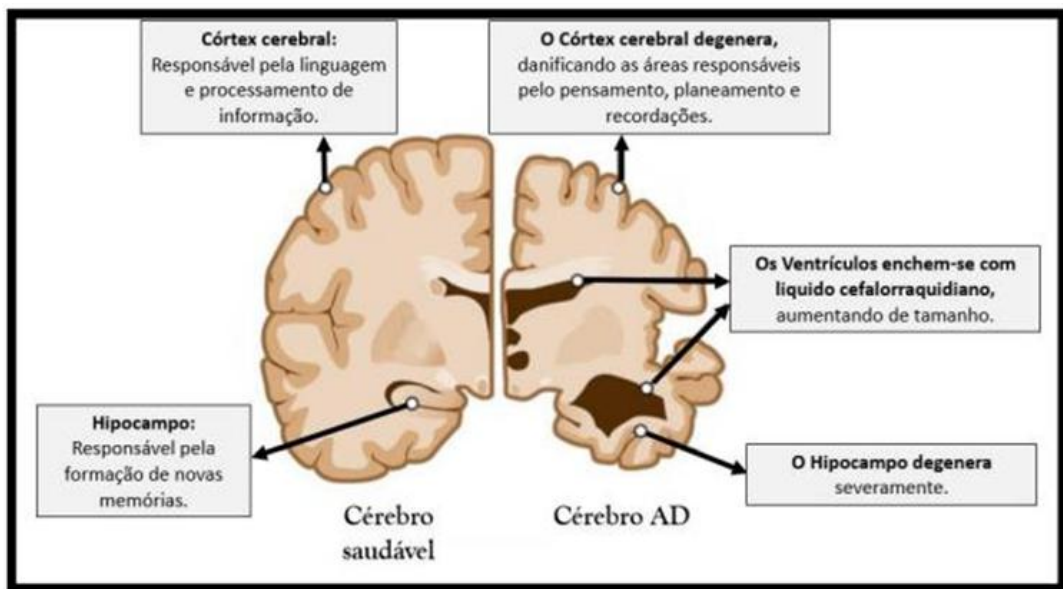
2.4.1 As Alterações Fisiopatológicas Características do Alzheimer

Acredita-se que a neuroinflamação é causada pela agregação de β amiloide ($A\beta$) das placas senis e a da proteína Tau nos emaranhados neurofibrilares (ENF), porém não foi confirmado se a inflamação é a causa da DA, ou se é uma resposta de defesa do sistema imunológico do SNC, composta pelos astrócitos e pela microglia (Bittencourt; Müller, 2021, Vergallo et al., 2020; Zhang et al., 2013).

Portanto, tratamentos voltados para inflamação poderiam apresentar melhoras significativas nos sintomas e no avanço da patologia (Merighi et al., 2022; Sarlus; Heneka, 2017).

A Figura 1 apresenta a esquerda uma ilustração de um cérebro saudável, no qual os sulcos e giros são de tamanho regular. Já a direita, ilustra um cérebro com DA, na qual em razão da neurodegeneração, os giros diminuem de tamanho em razão da perda de neurônios, e o sulcos e ventrículos se tornam maiores.

Figura 1: Comparação cérebro saudável com cérebro DA.



Fonte: Cruz-Lopes, et al., 2022.

2.4.2 Sintomatologia do Alzheimer

Os sintomas do Alzheimer geralmente começam de forma silenciosa e progridem lentamente, fazendo com que os primeiros sinais e sintomas surjam somente anos ou até décadas após o início da doença, o que torna seu tratamento mais difícil (Alzheimer's Association, 2022; Sumsuzzman et al., 2022; Martins, 2018).

Os principais sinais são: a perda de memória, iniciando pelos acontecimentos mais recentes e avançando para as memórias de longo prazo; a desorientação, a qual os pacientes não reconhecem mais o ambiente onde se encontram, ou seja, perdem a noção do espaço-tempo; as dificuldades cognitivas e de execução, as quais a linguagem, raciocínio lógico e tarefas cotidianas são prejudicadas; as alterações comportamentais, de humor; o desenvolvimento de ansiedade, por comportamentos agitados e até agressivos e sintomas de depressão (Alzheimer's Association, 2022; Sumsuzzman et al., 2022; Martins, 2018).

2.4.3 Formas de Tratamento

Até o momento, não há cura para a DA, mas os tratamentos são variados, focados em amenizar os sintomas e tentar retardar o progresso da doença como:

- Medicamentos: inibidores da acetilcolinesterase, como donepezila, rivastigmina e galantamina, que agem para tentar melhorar a função cognitiva e a qualidade de vida. O memantina, um antagonista do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) também é usado para tratar sintomas moderados a graves da doença (Cummings et al., 2019).
- Tratamentos Não Farmacológicos: terapias, atividades cognitivas, programas que fornecem suporte familiar (Sperling et al., 2020).
- Pesquisa em Novos Tratamentos: abordagens como imunoterapia para eliminar placas de beta-amiloide, terapias atuantes na proteína tau, antiestresse oxidativo e anti-inflamatórios (Sperling et al., 2020).

2.4.4 O Alzheimer e a Microglia

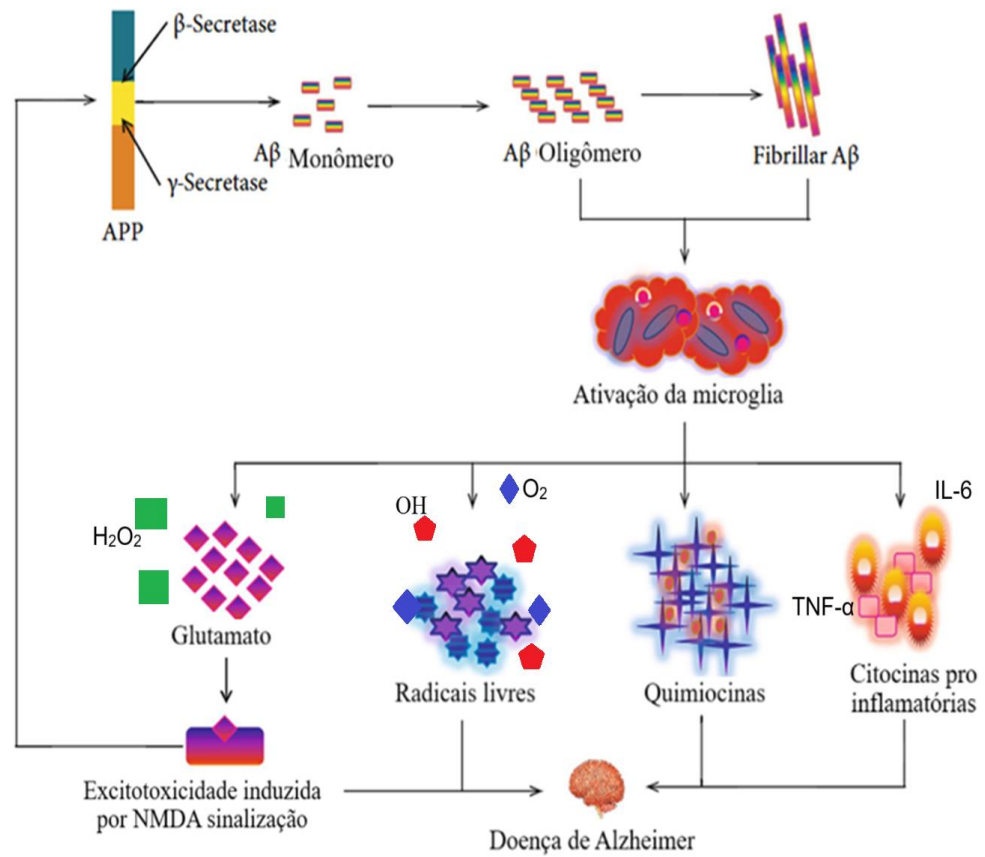
Micróglia sendo específica da região do SNC, no qual circula pelo parênquima cerebral; é ativada em casos de neuroinflamação, atuando na fase aguda e permanecendo na fase crônica (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Bridlance; Thion, 2023; Heneka et al., 2015; Jevtic et al., 2017; Li et al., 2019, Madore et al., 2022; Machado; Carvalho; Rocha Sobrinho, 2020; Martins, 2018; Masuda et al., 2019; Minter; Taylor; Crack, 2016; Neher; Neniskyte; Brown, 2012; Yang, 2019).

Em processos de neurodegeneração, de lesões ou infecções cerebrais, são os RRP's os responsáveis pela ativação da micróglia para defesa das regiões danificadas, fagocitando os fragmentos e ativando os MHCs estes por sua vez, são receptores localizados na membrana celular e outros receptores complementares, liberando citocinas pró-inflamatórias que iniciam a neuroinflamação (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022; Block; Zecca; Hong, 2007; Johnson et al., 2021; Sereniki; Vital, 2008).

Essa ativação pode se mostrar benéfica em situações de dano agudo, ou seja de curto prazo. Mas a ativação crônica, que por sua vez é de longo prazo, está associada a várias doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Alzheimer (Abbas; Litchaman; Pillai, 2022).

A Figura 2 demonstra como a micróglia é ativada pelos agregados fibrilares de A β , após a ativação ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, EROs (espécie reativa de oxigênio) também chamados de radicais livres, e por último a figura demonstra o acúmulo de glutamato, neurotransmissor excitatório do SNC, sinalizando a NMDA (N-metil-D-aspartato) que causa uma neurotoxicidade, que atua na A β , gerando um ciclo inflamatório e levando ao quadro de DA.

Figura 2: A micróglia e a ativação do Alzheimer.



Fonte: Traduzida e adaptada de Sumsuzzman et al., 2022.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da histidina em cultura de macrófagos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor concentração de LPS para a ativação de macrófagos *in vitro* para simular a micróglia.
- Analisar o perfil molecular intracelular dos macrófagos após tratamento com diferentes concentrações de histidina pela Espectroscopia de Raman.
- Avaliar se a histidina pode ser utilizada como tratamento para a Doença de Alzheimer.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A maioria dos materiais encontravam-se disponíveis pelo Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, Brasil.

- Macrófagos J774: linhagem de macrófagos de camundongos BALB/c, estocados a -80°C (ATCC, EUA).
- Lipopolissacarídeo – LPS armazenado em Eppendorf de 10 µL a -20°C; adquirido em parceria com o Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil;
- Placas de poços para cultura celular (TPP, Suíça).
- Frascos para cultivo celular 150 mL com tampa com filtro, disponíveis no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG, Ponta Grossa, Brasil;
- Meio de cultivo RPMI 1640 (Vitrocell®, Brasil);
- Soro fetal bovino - SFB (NovaBiotecnologia®, Brasil);
- Tripsina (Vitrocell, Brasil);
- MTT - disponibilizado pelo Laboratório de Biologia do Departamento de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UEPG, Ponta Grossa, Brasil;
- Histidina em pó - em estoque;
- Brazol foi doado pelo Laboratório de Biologia Celular;
- DMSO (LGC Biotecnologia®, Brasil);
- Balança graduada Quimis: fornecida pela AAKERA Solutions Ltda., Porto Alegre, Brasil; do Laboratório de Biologia do Departamento de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UEPG, Ponta Grossa, Brasil;
- Microscópio invertido (Carl Zeiss®);
- Estufa Sanyo Scientific, Modelo COM-19AIC (UV): Osaka, Japão;
- Cilindro de dióxido de carbono: White Martins, Gases Industriais, Ponta Grossa, Brasil;
- Cabine de Fluxo Laminar BioSafe Plus A2 adquirido de Grupo Veco®, Campinas, Brasil;

- Espectroscopia de Raman: Equipamentos Horiba / Xplora Plus e Bruker / SENTERRA; Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU), UEPG, Ponta Grossa, Brasil;
- Centrífuga disponível no Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG, Ponta Grossa, Brasil.
- Pipeta automática adquirida de KASVI®, BR

4.1 CULTIVO CELULAR PARA ATIVIDADES EXPERIMENTAIS

Realizou-se o cultivo de macrófagos da linhagem J774 em meio RPMI enriquecido a 10% com Soro Fetal Bovino (SFB) - amostras. Todo o experimento foi realizado dentro de um ambiente estéril em uma cabine de fluxo laminar (esterilizada com álcool 70% e 20 minutos de UV antes e após o uso).

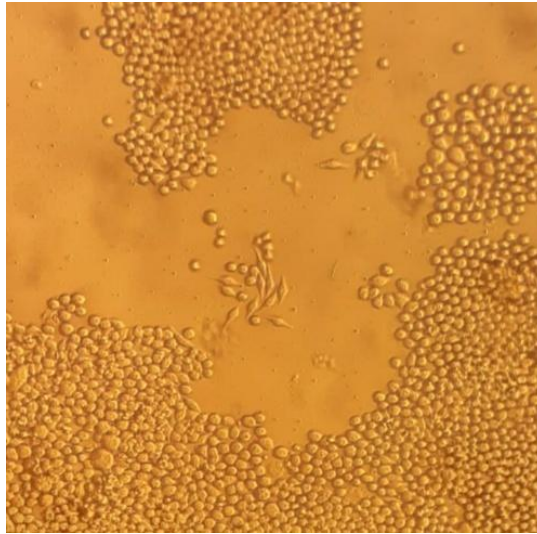
As células foram mantidas em estufa de dióxido de carbono (CO_2) na concentração de 5% e na temperatura de 37°C , sendo o meio substituído de acordo com a confluência celular. A Figura 3 apresenta, a esquerda uma amostra recém preparada, e a direita a parede de aderência preenchida (100% de confluência), como é possível visualizar pelo microscópio ótico conforme a Figura 4, na qual se vê os macrófagos aderidos e aglomerados e ao centro da imagem macrófagos em duplicação.

Figura 3: Amostras celulares recém feita e pós incubação.



Fonte: A Autora.

Figura 4: Campos de macrófagos aglomerados e em processo de multiplicação.



Fonte: A Autora.

4.2 CONTAGAEM PARA O PLAQUEAMENTO

Para realização de novas amostras de células ou contagem, o meio era removido por aspiração e posteriormente adicionado 5 mL de tripsina para remoção das células da parede de aderência, a tripsina foi neutralizada com 10 mL de RPMI.

O volume total de tripsina e RPMI foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular homogenizado com RPMI, desse volume foi coletado uma alíquota depositada sobre a Câmara de Neubauer e levado ao microscópio ótico invertido, como é visto na Figura 5.

Após a contagem aplicou-se a seguinte fórmula:

$$N^{\circ} \text{ células por mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células} \times 10^4 \times \text{diluição (mL)}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes (4)}}$$

Fonte: OLIVIERA, 2020

Figura 5 : Macrófagos J774 vistos na Câmara de Neubauer.



Fonte: A Autora.

4.3 PLAQUEAMENTO PARA O TESTE DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

Após a contagem, transferiu-se as células homogenizadas com meio para uma placa de poços contendo meio de cultivo. A concentração de LPS foi estabelecida com base na literatura de Freeman et al., 2010. Após 24 horas de incubação, a placa foi analisada macroscopicamente e preparada para análise em MTT.

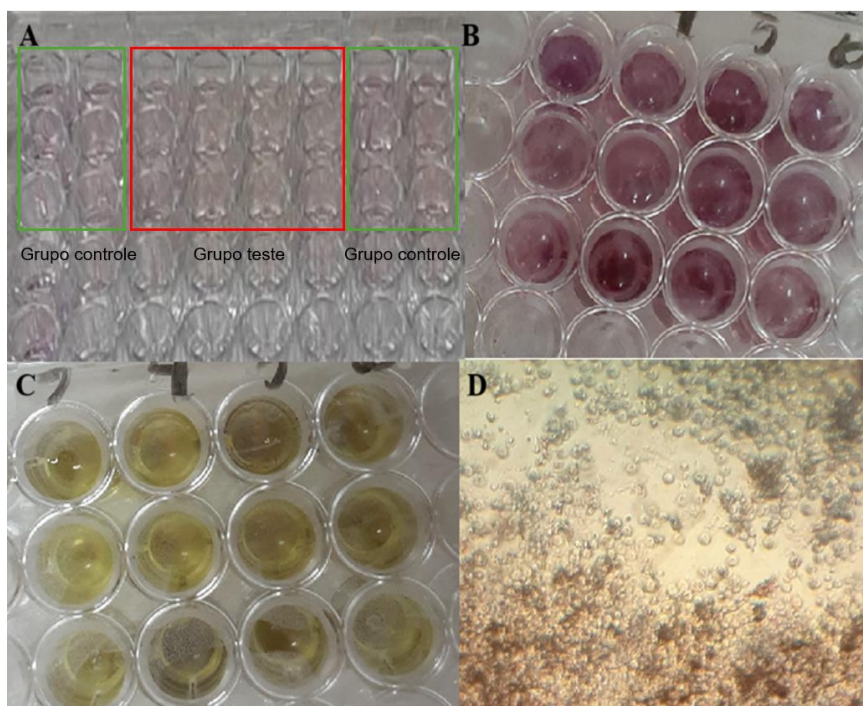
A placa foi dividida em colunas com diferentes conteúdos e finalidades (todas em triplicata). As primeiras e as últimas para controle de qualidade, e colunas centrais contendo LPS em concentrações de 0,0005 mg/mL, 0,001 mg/mL e 0,00125 mg/mL respectivamente para os volumes totais de 200 μ L.

4.4 PREPARO DOS MACRÓFAGOS PARA O ENSAIO DE MTT

Após 24 horas de incubação, o conteúdo dos poços foi totalmente removido e a partir do MTT 0,5 mg/mL em solução, foram adicionados 200 μ L em cada poço deixando-se agir por 1 hora na estufa de CO₂ a 37°C. A Figura 6 apresenta em A o MTT recém adicionado, em B e em C a análise macroscópica, onde é visto a alteração da coloração de roxo para amarelo, e em D a pela microscopia para analisar a morte celular (células escurecidas) e a degradação dos cristais. A placa foi encaminhada

para leitura, realizada por espectrofotometria, na leitura de 550 nm.

Figura 6: Macro e microscopia do Ensaio de MTT.



Fonte: A Autora.

4.5 PREPARO PARA A ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RAMAN

Para a análise de Raman foram realizados 3 novos cultivos de J774, em amostras 20 mL totais. A histidina foi calculada para as concentrações de 0,25%, 0,50% e 1%.

As amostras foram preparadas no momento de cada análise, sendo extraído manualmente da parede de cada garrafa uma alíquota de 10µL contendo as células e o meio, a qual foi depositada sob lâminas de quartzo. Para a amostra de histidina, a mesma foi triturada manualmente até a consistência de pó, para perder a cristalização e melhorar a leitura pelo equipamento.

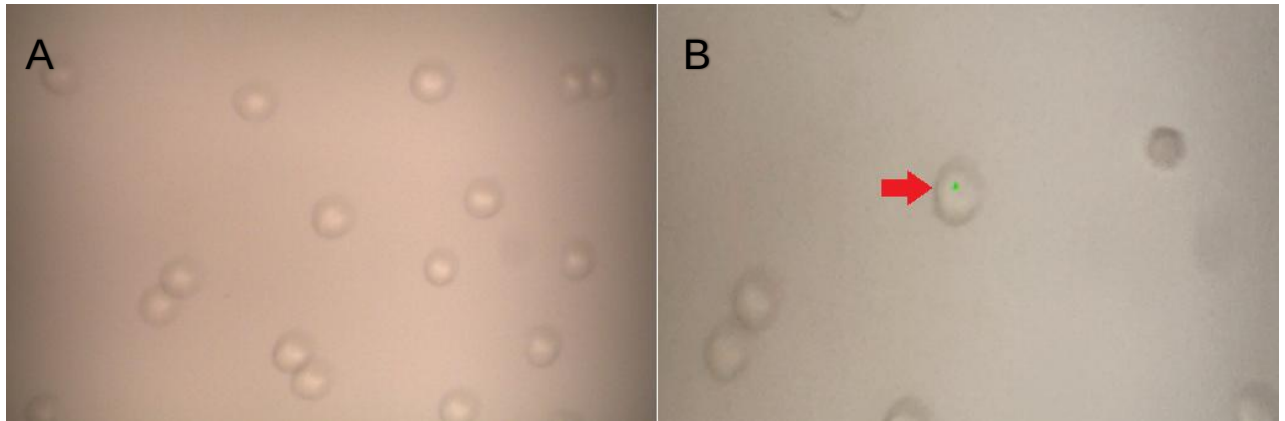
As leituras foram realizadas aplicando-se os seguintes parâmetros Espectroscopia de Raman:

- Potência do feixe (mW): 0.2.
- Objetiva: 20X.
- Range do espectro: 50-5000 cm^{-1} .
- Abertura utilizada (µm): 25.

- Comprimento de onda: 532 nm.

Na Figura 7 vê-se pela microscopia que, em A células vivas e em B como o laser (ponto verde indicado pela seta) se posiciona no objeto de estudo para possibilitar a análise.

Figura 7: Microscopia pela Espectroscopia de Raman.



Fonte: A Autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

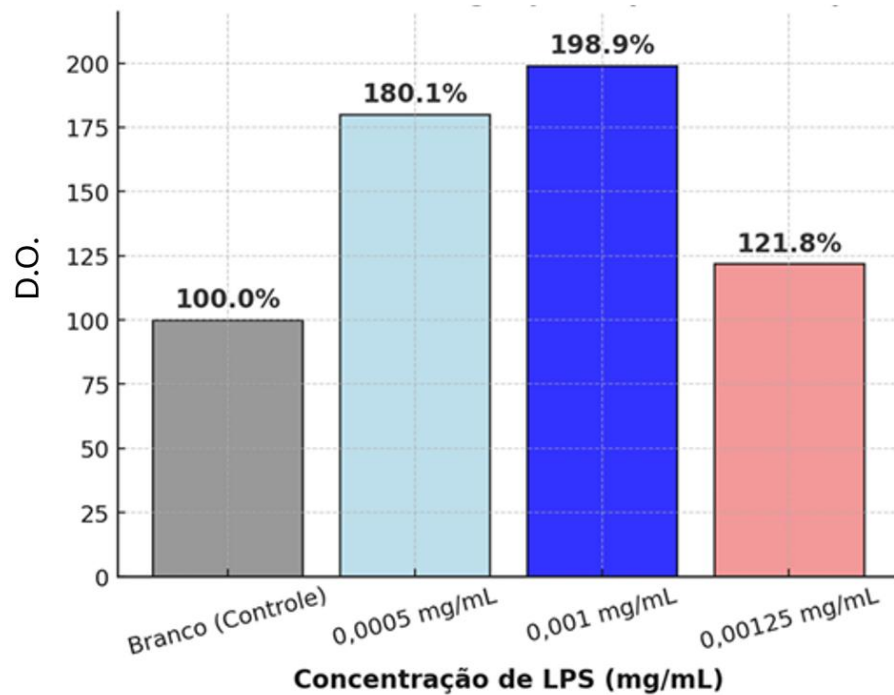
O ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazóliobrometo (MTT), ou viabilidade celular por MTT é um ensaio colorimétrico que mede a atividade metabólica, avaliando a proliferação, viabilidade e citotoxicidade. Utiliza a redução de sais de tetrazólio (de coloração amarela), juntamente com compostos de formazan (de coloração roxa) (Bochnie,Gregório, Maciel, 2016; Stoddart, 2011; Mosmann, 1983).

Dessa forma, as células vivas e ativas degradam os sais de MTT, enquanto as inativas e as mortas são tingidas, tornando possível medir a citotoxicidade de compostos testados (Bochnie,Gregório, Maciel, 2016; Stoddart, 2011; Mosmann, 1983).

Freeman et al., 2010 utilizou concentrações de LPS entre 0,1 e 1 µg/mL para investigar respostas inflamatórias em macrófagos, a maior concentração se mostrou confiável, porém, considerou-se importante testar concentrações maiores para ter uma variabilidade de resultados.

Dos resultados obtidos pela leitura da Densidade Ótica pela espectrofotometria, calculou-se a viabilidade celular, e obteve-se que a concentração de 0,0005 mg/mL, 0,001 mg/mL e 0,00125 mg/mL de LPS apresentaram 180%, 198% e 121% respectivamente, conforme o gráfico 1 a seguir ilustra. Indicando a concentração de 0,001 mg/mL de LPS como a mais viável para os experimentos seguintes, pois agiu sob os macrófagos ativando a resposta imunológica de forma mais intensa que a concentração inferior, mas sem danificá-los como a concentração superior.

Gráfico 1: Resultados Viabilidade Celular por MTT.



D.O. (Densidade Ótica)

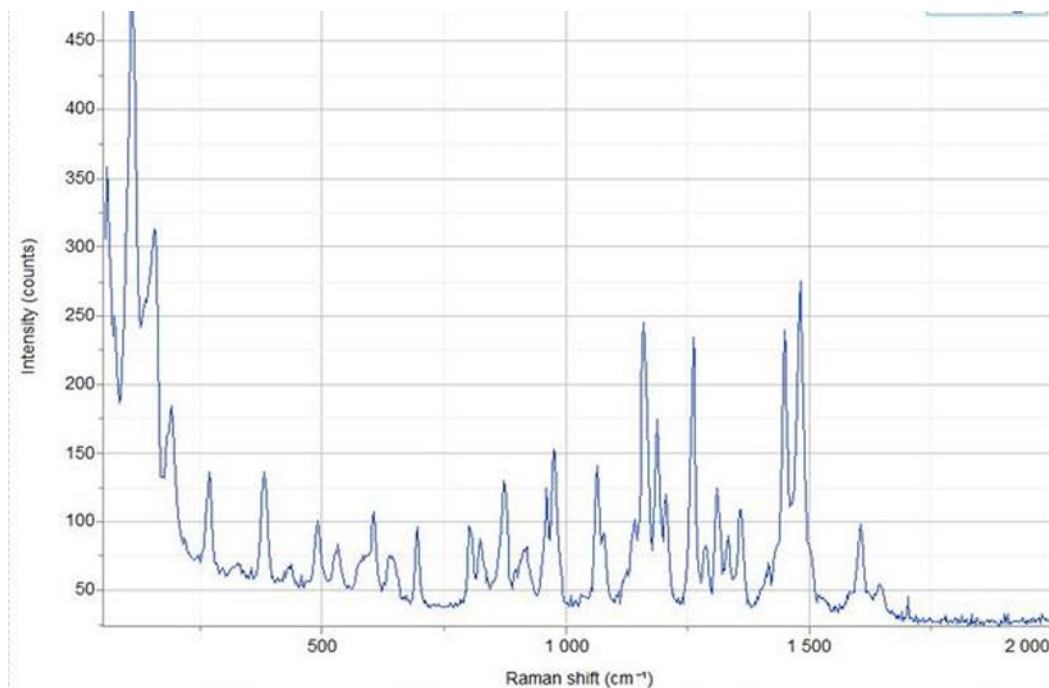
Fonte: A Autora.

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RAMAN

O processo de análise em Raman funciona pelo princípio do espelhamento inelástico de radiação por moléculas, sendo essas polarizadas por um laser, que é incidido no objeto de estudo. Esse laser gera vibrações das moléculas, gerando uma imagem no qual cada pico corresponde à uma composição química específica (Raman; Krishnan, 1928; Edmund, 2023; Springer, 2023).

Os resultados da análise da histidina em pó se encontram no Gráfico 2:

Gráfico 2: Resultados da análise de Histidina pela Espectroscopia.

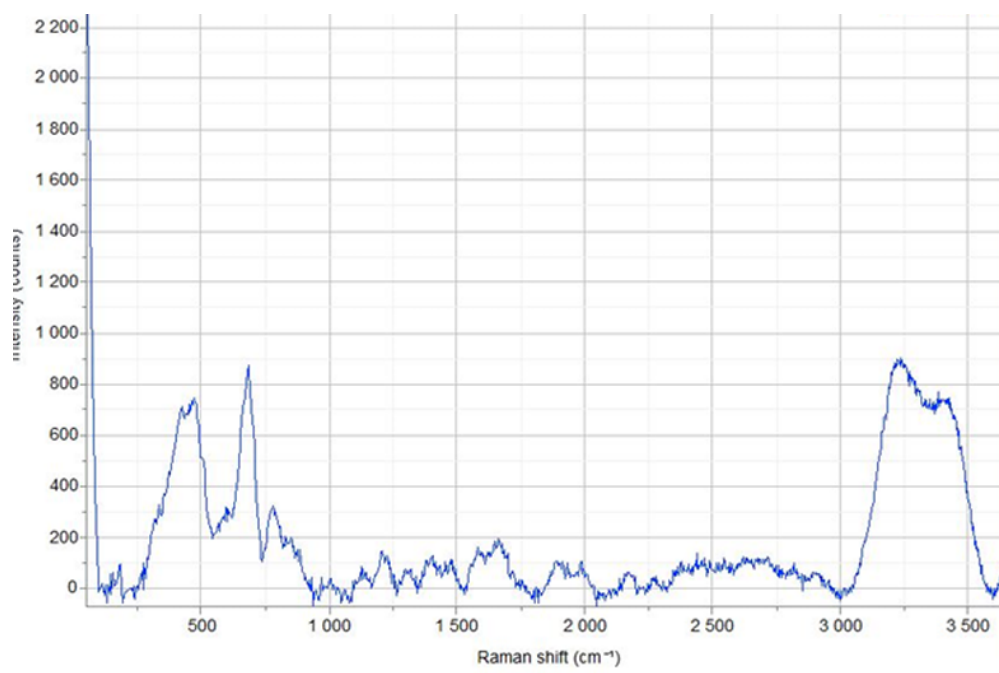


Fonte: Autora.

As bandas na região de $290\text{-}310\text{ cm}^{-1}$ que indicam vibrações de estiramento de ligações C-H em alcanos, presentes na cadeia lateral do anel imidazol, assim como as da região de $500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ de ligações C-C, $600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ e C-H na região de $700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ presentes estão associadas a estruturas cíclicas ou aromáticas. As bandas na faixa de $400\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ correspondem a vibrações de ligações C-C ou C-H, indicando a presença de ligações simples entre átomos de carbono e hidrogênio na estrutura molecular. A detecção de bandas na região de $2000\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$, geralmente atribuídas a estiramentos de ligações $\text{C}\equiv\text{C}$, não é típica para a histidina indicando impurezas ou artefatos instrumentais (Pinheiro, 2009; Smith; Dent, 2004).

Os resultados do meio RPMI se encontram na Gráfico 3:

Gráfico 3: Resultados da análise de RPMI pela Espectroscopia.

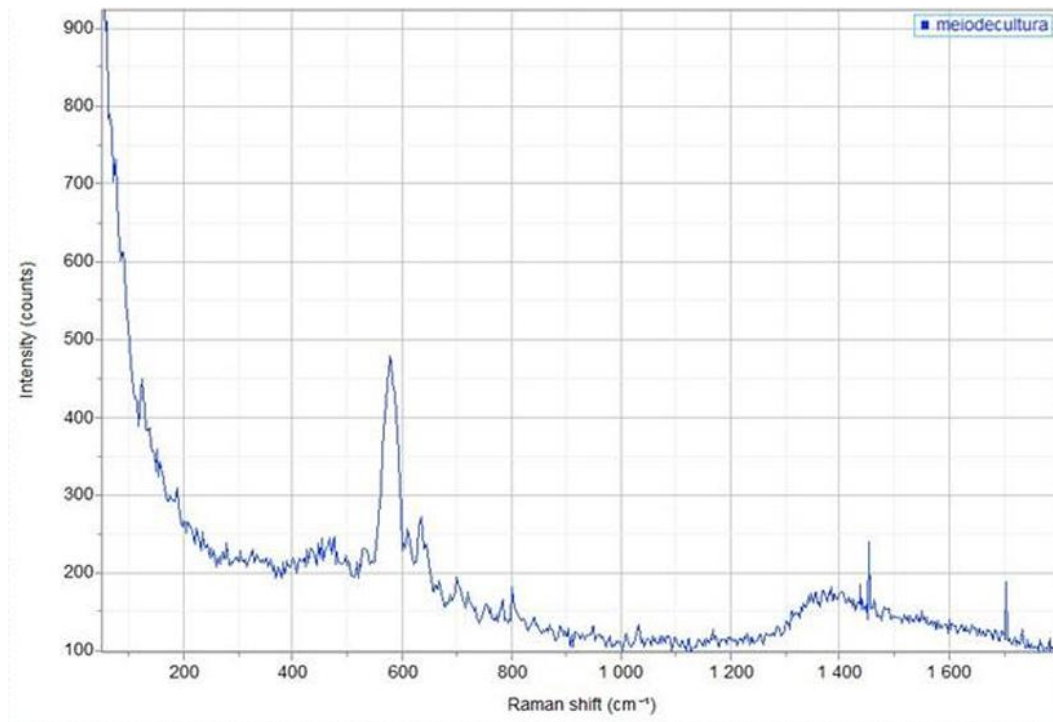


Fonte: Autora.

Os resultados da análise do RPMI Puro foram que os picos na região 500–700 cm^{-1} indicam a presença de ligações covalentes simples, como C–C ou C–O, associadas a componentes estruturais básicos do meio. A intensidade em 3000–3500 cm^{-1} sugere pequenas quantidades de grupos O–H ou C–H, mas a baixa complexidade do espectro reflete a necessidade de suplementação para suportar a viabilidade celular (Pinheiro, 2009; Smith; Dent, 2004).

Os resultados da análise do meio de cultivo se encontram no Gráfico 4:

Gráfico 4: Resultados da análise do meio de cultivo pela Espectroscopia.

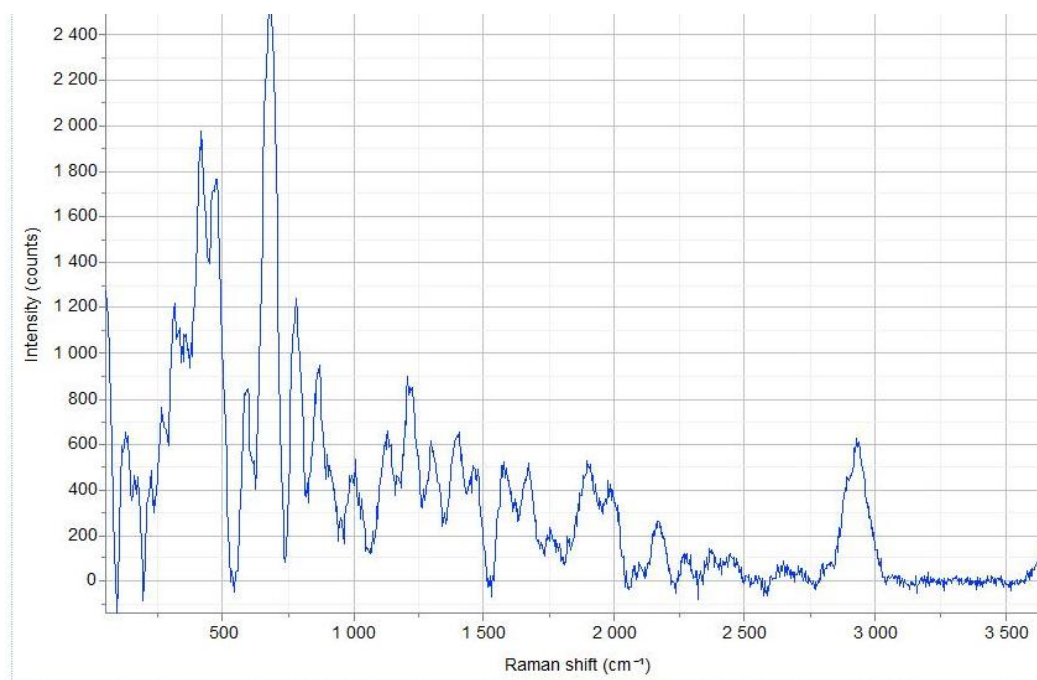


Fonte: Autora.

Os resultados da análise do meio de cultivo confirmam que a suplementação com SFB resultou em um aumento moderado na região de 500–700 cm⁻¹, associado à introdução de proteínas e compostos lipídicos do soro (Pinheiro, 2009; Smith; Dent, 2004).

Os resultados da análise dos macrófagos J774 se encontram no Gráfico 5:

Gráfico 5: Resultados da análise dos macrófagos pela Espectroscopia.



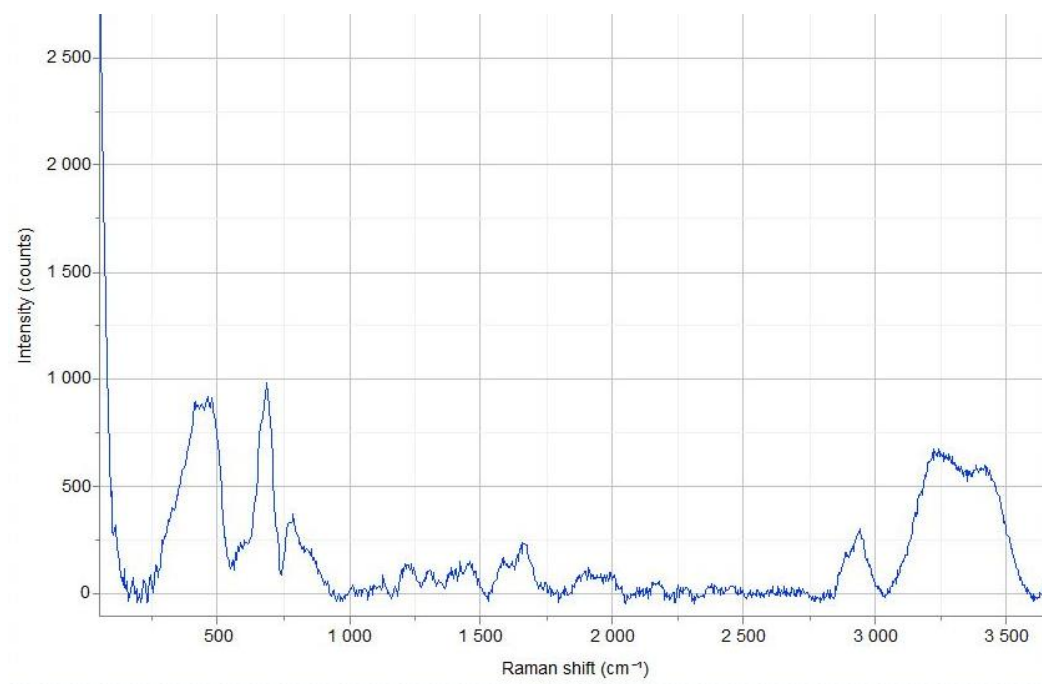
Fonte: Autora.

Os resultados da análise dos macrófagos J774 foram que a leitura em 500 cm^{-1} pode ser atribuída à presença de defeitos ou ligações heterogêneas no material. Já as leituras e a presença da banda 2D reforçam a hipótese de boa organização estrutural, mas com certo grau de desordem na amostra (Ferrari, 2007; Smith; Dent, 2004).

O resultado da leitura dos macrófagos sem interferência de histidina foi a base para interpretação das análises com histidina em diferentes concentrações.

Os resultados da análise da histina 0,25% se encontram no Gráfico 6:

Gráfico 6: Resultados da análise de HIS 0,25% pela Espectroscopia.



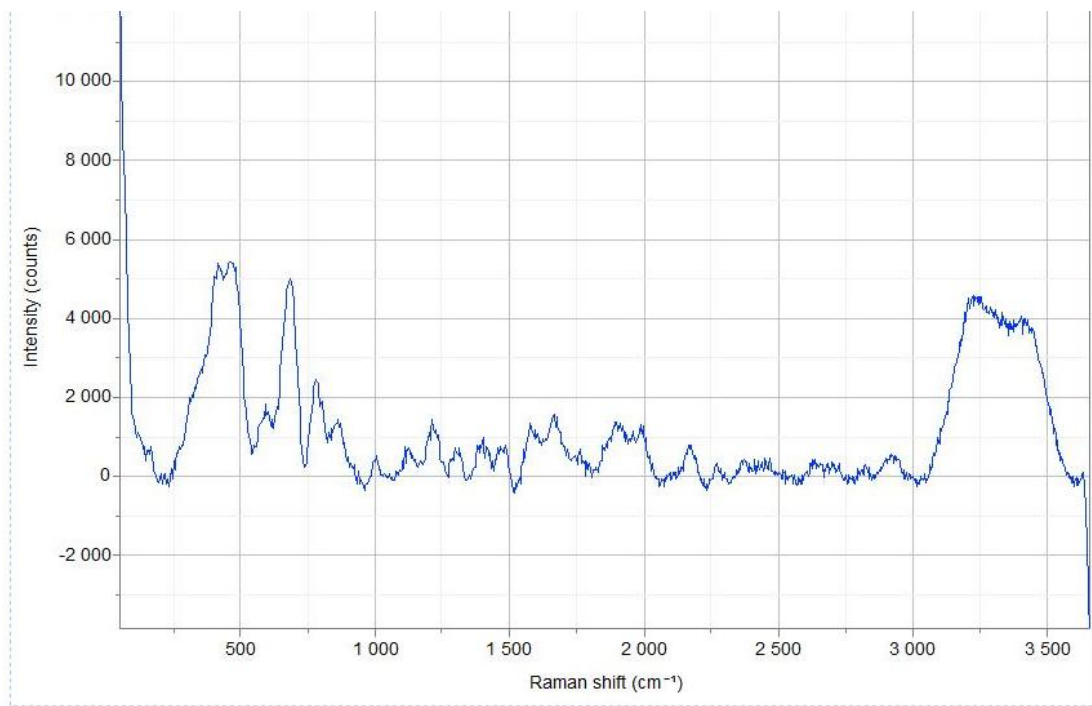
Fonte: Autora.

Os resultados da análise dos macrófagos J774 tratados com 0,25% de Histidina foram que houve um aumento significativo na região 500–700 cm^{-1} , regiões associadas a proteínas estruturais e fosfolipídios. A presença de picos em 3000–3500 cm^{-1} , atribuídas a vibrações de grupos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}$, sugere um aumento moderado no metabolismo, potencialmente associado à ativação leve de vias inflamatórias (Dosal, 2019; Ferrari, 2007; Feuerer et al., 2022; Movasaghi; Rehman; Rehman, 2007; Pinheiro, 2009; Smith; Dent, 2004; Wang et al., 2020).

Essas leituras sugerem que a concentração de 0,25% de histidina promoveu uma ativação metabólica inicial, ou seja, inflamatória. Na Doença de Alzheimer, a microglia ativada libera citocinas pró-inflamatórias (como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6) que são associadas a neurodegeneração.

Os resultados da análise da histidina 0,50% se encontram no Gráfico 7:

Gráfico 7: Resultados da análise de HIS 0,50% pela Espectroscopia.



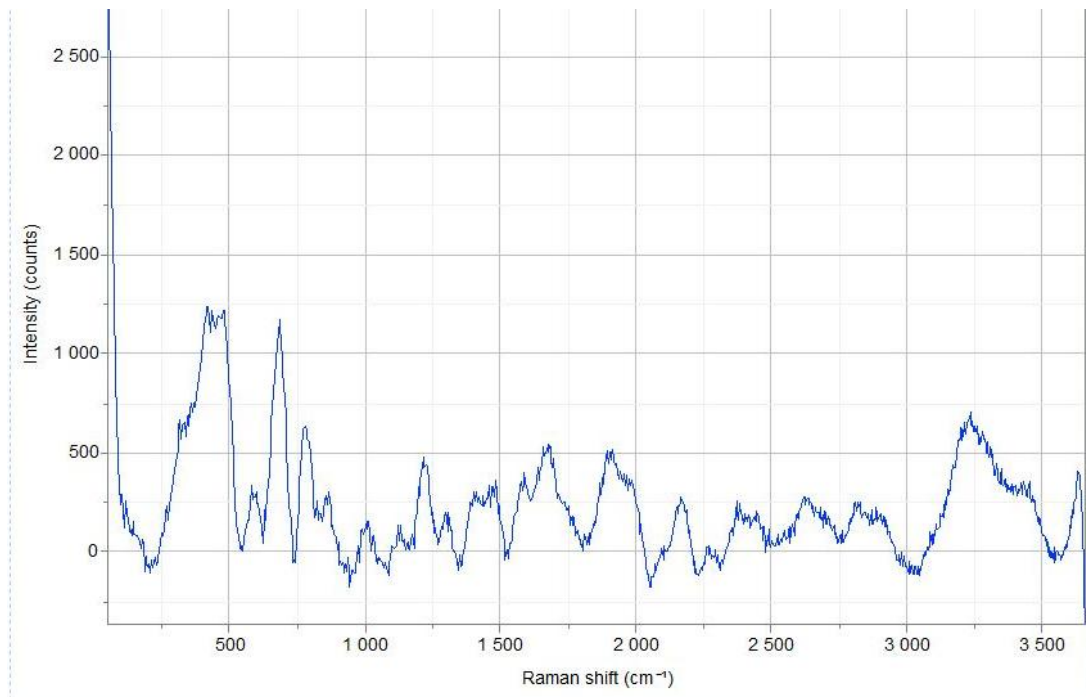
Fonte: Autora.

Os resultados da análise dos macrófagos J774 tratados com 0,50% de Histidina foram que a alta intensidade de picos na região de 500–700 cm^{-1} sugere uma ativação inflamatória intensa, acompanhada por variações em 3000–3500 cm^{-1} . Esse padrão reflete maior demanda metabólica para síntese proteica e utilização de lipídios, indicando uma ativação mais intensa de vias pró-inflamatórias. Essas alterações também incluem maior intensidade nas regiões 1200–1500 cm^{-1} , atribuídos a deformações de ligações CH_2 e CH_3 , associadas a cadeias lipídicas, e estiramentos vibracionais de amidas (Dosal, 2019; Ferrari, 2007; Feuerer et al., 2022; Movasaghi; Rehman; Rehman, 2007; Pinheiro, 2009; Smith; Dent, 2004; Wang et al., 2020).

Esses dados indicam que a concentração de 0,50% de histidina induziu uma maior resposta inflamatória e respostas imunológicas amplificadas comparada com a concentração anterior. Este acúmulo de lipídeos e a ativação metabólica está associado à inflamação crônica, interferindo nas funções neurais.

Os resultados da análise da histidina 1% se encontram no Gráfico 8:

Gráfico 8: Resultados da análise de HIS 1% pela Espectroscopia.



Fonte: Autora.

Os resultados da análise dos macrófagos J774 tratados com 1% de Histidina foram que a região 500–700 cm^{-1} e 2800–3500 cm^{-1} tiveram um aumento, indicando uma possível saturação metabólica. As bandas em 1000–1200 cm^{-1} , atribuídas a componentes de ácidos nucleicos e fosfolipídios, sugerem uma ativação intensa de vias pró-inflamatórias. A atividade reduzida pode refletir um mecanismo de controle inflamatório e adaptação metabólica (Dosal, 2019; Ferrari, 2007; Feuerer et al., 2022; Movasaghi; Rehman; Rehman, 2007; Pinheiro, 2009; Smith; Dent, 2004; Wang et al., 2020).

Tal comportamento indica que as células chegaram ao seu limite metabólico e de gasto energético. Na DA, a resposta inflamatória exacerbada é frequentemente observada, com macrófagos superativados, contribuindo para um ciclo vicioso de inflamação crônica que acelera a neurodegeneração.

CONCLUSÃO

Pode concluir-se, que a concentração de 0,001 mg/mL de LPS apresentou uma viabilidade de 198% nos macrófagos J774, pois ativou a resposta inflamatória celular de forma equilibrada, sem danificar os macrófagos.

Dos resultados da Espectroscopia de Raman, a concentração de 0,25% induziu alterações moderadas nas regiões relacionadas a proteínas estruturais e interações moleculares, sugerindo atividade basal equilibrada, ou seja, do seu gasto energético. A concentração de 0,50% demonstrou uma atividade mais intensa, caracterizando uma resposta inflamatória maior. A concentração de 1% resultou em um impacto mais intenso nos macrófagos, apresentando uma reorganização metabólica e maior consumo energético, indicando um perfil pró-inflamatório característico da Doença de Alzheimer.

As modificações no metabolismo celular e a intensificação da inflamação nos macrófagos tratados com histidina refletem padrões semelhantes à neuroinflamação observada na DA, onde a ativação de células imunes, como a microglia, desempenha um papel central na progressão da doença. No entanto, como foi observado um efeito inflamatório nas concentrações testadas, é fundamental que mais estudos sejam realizados para investigar a eficácia da histidina como um possível auxílio terapêutico na modulação da inflamação e no tratamento da Doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 10^a ed. Elsevier, 2022.

Alzheimer's Association. 2022. **Alzheimer's Disease Facts and Figures**. Alzheimer's & Dementia, v. 18, n. 4, p. 700-789, 2022.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report, 2022. Disponível em: <https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2022.pdf>. Acesso em: 02 setembro 2024.

BARBEIRO, D. F. **Participação da célula B-1 na resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo**. 2009. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

BASCONES, A. et al. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 14, n. 9, p. e680-e688, 2009.

BERTON, J. **Estudo do papel da histidina, histamina e antagonistas histaminérgicos na progressão e diferenciação celular em um modelo de melanoma murino**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa em Associação Ampla com Universidade Estadual do Centro-Oeste. Ponta Grossa, 2015.

BITTENCOURT M.F.; MÜLLER N.V. Biomarcadores gliais da Doença de Alzheimer. **Clin Biomed Res.**; 41(2), 2021. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/view/108906>. Acesso em: 06 de outubro de 2023.

BLENNOW, K. et al. Clinical utility of cerebrospinal fluid biomarkers in the diagnosis of early Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 11, n. 1, p. 58-69, 2015.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.

BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 2017.

BRIDLANCE C.; THION M.S. Multifaceted microglia during brain development: Models and tools. **Front Neurosci.**, v. 17:1125729, 2023.

BROSNAN M.E.; BROSNAN J.T. Histidine Metabolism and Function. **Journal of Nutrition**, v. 150(Suppl 1). p. 570S-2575S, 2020.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3-S23, 2010.

CRUZ-LOPES, L. et al. Nanopartículas no tratamento da doença de Alzheimer: artigo de revisão. **Millenium - Revista de Educação, Tecnologias e Saúde**, 2(ed espec nº10), 77-92. 2022.

CUMMINGS, J. et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. **Alzheimer's & Dementia**, v. 15, n. 3, p. 365-377, 2019.

DADOVÁ J.; GALAN S.R.; DAVIS B.G. Synthesis of modified proteins via functionalization of dehydroalanine. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 46, p. 71-81, 2018.

DELAVERY, B. M. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753-762, 2011.

DENG, X. et al. The role of histidine supplementation in regulating oxidative stress and cell growth protection. **Journal of Oxidative Stress Research**, v. 34, n. 5, p. 112-124, 2021.

DOSAL, L. C. O. **Identificación no-invasiva de sustancias biológicas por medio de espectroscopía Raman**. 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/19476337.2019.1635648>. Acesso em: 7 janeiro de 2025.

EDMUND, O. **Basic Principles of Raman Scattering and Spectroscopy**. Disponível em: www.edmundoptics.com. Acesso em: 2 dezembro de 2024.

FERRARI, A. C. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. **Solid State Communications**, v. 143, n. 1–2, p. 47–57, 2007.

FEUERER, N. et al. Raman Microspectroscopy Identifies Biochemical Activation Fingerprints in THP-1- and PBMC-Derived Macrophages. **Biomedicines**, v. 10, p. 989, 2022.

FREEMAN, T. C.; et al. Transcriptomic analysis of murine macrophages treated with

TLR ligands. **BMC Immunology**, v. 11, p. 15, 2010.

FRICK, L. et al. Histamine regulation of microglia: gene-environment interaction in the regulation of central nervous system inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 57, p. 268-275, 2016.

GINHOUX, F. et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation, and function. **Nature Immunology**, v. 17, n. 1, p. 34-40, 2016.

GONÇALVES, C. L. **Mecanismos de neurotoxicidade induzida pela administração de LPS e paraquat**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

HAYASHI J.; MASAKA T & ISHIKAWA I. Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. **Infect Immun**, v. 67(1), p. 417-420, 1999.

HENEKA, M.; KUMMER, M.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nat Rev Immunol**, v. 14, p. 463–477, 2014.

HENEKA, M.T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, 388-405, 2015.

HENEKA, M.T., et al. Inflammation in Alzheimer's disease: a review. **Neurobiology of Aging**, v. 34(1), p. 11-27, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.012>, 2013. Acesso em: 18 de setembro de 2024.

HUANG, Y. et al. Mechanisms of LPS-Induced Inflammation: Pathogenesis and Therapeutic Approaches. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 15, p. 8812-8826, 2020.

JEVTIC S., et al. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. **Ageing Research Reviews**, v. 40, n. 1, 84-94, 2017.

JOHNSON, L. et al. Cellular metabolic responses to amino acid supplementation. **Cell Metabolism Studies**, v. 27, n. 4, p. 305–319, 2021.

KUMAR, S., et al. Role of Lipopolysaccharide (LPS) in the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. **Journal of Inflammation Research**, 14, 1459-1472, 2021.

LAURENTI, E.; GÖTTGENS B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. **Nature**, 553(7689), 418-426, 2018.

LEE, K. Y. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. **Medical Biological Science and Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2019.

LI, C., et al. Lipopolysaccharide (LPS) in Inflammatory Pathways: Implications for Disease Models. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25(12), p. 1403-1415, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171122121652>. Acesso em: 18 de outubro de 2024.

LI, J. et al. Modulation of histidine metabolism in inflammatory and cancer therapies. **Journal of Inflammatory Research**, v. 99, p.11, 2020.

LI, Q., et al. (2019). Developmental heterogeneity of Microglia and brain myeloid cells revealed by deep single-cell RNA sequencing. **Neuron**, v. 101(2), p.207-223, 2019

LIU, Y., et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation and its modulation in the study of neurodegenerative diseases. **Frontiers in Immunology**, v.13, 2022.

MACHADO A. P. R.; CARVALHO, I. O.; ROCHA SOBRINHO, H. M. da. Neuroinflamação na doença de Alzheimer. **Revista Brasileira Militar de Ciências**. ISSN 2447-9071, 2020.

MAHL, C. R. A. **Adsorção de íons cobre em esferas de quitosana modificada quimicamente e alginato na presença do peptídeo beta-amiloide ou histidina**. 1 recurso online (101 p.) Tese (doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2018.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686,2004.

MARTINEZ, F. et al. Regulation of macrophage inflammatory responses in cell culture models. **Immunology Insights**, v. 17, n. 5, p. 289–298, 2020.

MARTINS, A. T. R. **A Resposta Imunológica Inata na Doença de Alzheimer**. 2018. Relatório de Estágio e Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Portugal, 2018.

MASTERS, C.L., et al. Alzheimer's disease. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 1:15056. DOI: 10.1038/nrdp.2015.56.

MASUDA T, et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human Microglia

at single-cell resolution. **Nature**, v. 566, p.388–392, 2019.

MERIGHI, S.; et al. Microglia and Alzheimer's Disease. **Int. J. Mol. Sci.** v. 23, n.12990, 2022.

MINTER, M. R.; TAYLOR J.M.; CRACK P.J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 136, n. 3, 457-474, 2016.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. . Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 493–541, 2007.

MURPHY, K., et al. (2016). **Janeway's Immunobiology** (9th ed.). New York: Garland Science.

MUSZYNSKI P., et al. YKL-40 as a potential biomarker and a possible target in therapeutic strategies of Alzheimer's disease. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 15(6), p.906-17, 2017.

NEHER, J. J.; NENISKYTE U., BROWN G.C. Primary Phagocytosis of Neurons by Inflamed Microglia: Potential Roles in Neurodegeneration. **Journals Frontiers Pharmacology**, Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, UK, v. 3, 01-09, 2012.

ORKIN, S. H.; ZON, L.I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. **R. Cell**, v. 132(4), p.631-644, 2008.

PARSONS M.E. GANELLI C.R. Histamine and its receptors. **Brazilian Journal of Pharmacol.** v.147 Suppl 1(Suppl 1), p.S127-35, 2006.

PINHEIRO, G. S. **Estudo de aminoácidos por espectroscopia Raman**. 2009. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/11831/1/2009_dis_gspinheiro.pdf. Acesso em: 7 novembro de 2024.

POLUHA, R. L.; GROSSMANN, E. **Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions**. **Brazilian Journal of Pharmacol.**, v.1(1), p.60–65.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new type of secondary radiation. **Nature**, v. 121, p. 501-502, 1928.

RIBEIRO, A. R. B. **Espectroscopia Raman aplicada ao estudo da diferenciação funcional de células: uma avaliação sobre os fenótipos M1 e M2 de macrófagos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Maceió, 2021.

SARLUS, H.; HENEKA, M.T. Microglia in Alzheimer's disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.127(9), p.3240-3249, 2017.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista Psiquiátrica**, v. 30, n. 1, 01-17, 2008.

SIQUEIRA, A. M. et al. **Imunofarmacologia**. 1ª edição Rio de Janeiro IOC - Instituto Oswaldo Cruz. : il. - (Série em biologia celular e molecular) ISBN: 978-85-99974-08-7 - 2014.

SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004.

SPERLING, R. A., et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v.16(4), p. 511-520, 2020.

SPRINGER. **Introduction to Raman Spectroscopy**. SpringerLink, 2023.

STODDART MJ. Cell viability assays: introduction. **Methods in molecular biology**. (Clifton, N.J.). p. 1–6, 2011.

SUMSUZZMAN, D. et al. Microglia in Alzheimer's Disease: A Favorable Cellular Target to Ameliorate Alzheimer's Pathogenesis. Review article. **Mediators of Inflammation**, v.2022, Article ID 6052932, p.17, 2022.

TAMAS, R. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p.16–18, 2015.

TRUDLER, D.; FARFARA D.; FRENKEL D. Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 01-12, 2010.

VERGALLO A., et al. Association of plasma YKL-40 with brain amyloid- β levels, memory performance, and sex in subjective memory complainers. **Neurobiol Aging**.

v.96, p.22-32, 2020.

WANG, D. et al. Advances in single cell Raman spectroscopy technologies for biological and environmental applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 64, p. 218–229, 2020.

YANG, S. H. Cellular and Molecular Mediators of Neuroinflammation in Alzheimer Disease. **International Neurology Journal** (INJ), v. 23, p.54-62, 2019.

ZHANG, B. et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. **Cell**, v.153(3), p.707-720, 2013.