



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



José Marreiro de Sales Neto

**Patulina inibe a produção de óxido nítrico induzida por LPS ao suprimir a via
de sinalização das MAP quinases**

João Pessoa – PB

2022

José Marreiro de Sales Neto

Patulina inibe a produção de óxido nítrico induzida por LPS ao suprimir a via de sinalização das MAP quinases

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, nível Doutorado, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**.

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Orientadora

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Coorientador

João Pessoa – PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S163p Sales Neto, José Marreiro de.

Patulina inibe a produção de óxido nítrico induzida por LPS ao suprimir a via de sinalização das MAP quinases / José Marreiro de Sales Neto. - João Pessoa, 2022.

108 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Substâncias naturais - Patulina. 2. 4-hidroxi-4H-furo(3,2-C)-piran-2(6H)-ona. 3. Clavacina. 4. Macrófagos. 5. Inflamação aguda. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9 (043)

José Marreiro de Sales Neto

Patulina inibe a produção de óxido nítrico induzida por LPS ao suprimir a via de sinalização das MAP quinases

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, nível Doutorado, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**.

Aprovado em 10 de agosto de 2022, João Pessoa – PB.

Sandra Rodrigues Mascarenhas

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Orientadora

Ulrich

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
UFPB – Coorientador

Fabiola da Cruz Nunes

Profa. Dra. Fabiola da Cruz Nunes
UFPB – Especialista externa ao programa

Janeusa

Profa. Dra. Janeusa Trindade de Souto
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Especialista externa ao programa e a instituição

Marcia Regina Piuvezam

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
UFPB – Especialista interna ao programa

Tatjana Keesen de Souza Lima

Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
UFPB – Especialista interna ao programa

Dedico este trabalho à minha família, meus parentes e amigos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por sua Divina Misericórdia. Deus é o Ser Supremo; Deus é a Providência; Deus é a Realização. Obrigado por me ajudar a superar todas as dificuldades!

Aos meus pais, Maria Rozilene Sales e Josinaldo Manoel da Silva (*in memoriam*). Mãe, você é o meu maior exemplo de amor, sempre te amei e sempre te amarei. Pai, no dia em que você partiu uma parte de mim foi junto com você, mas todo o amor que sinto por você permanecerá para sempre em meu coração. Meus pais, palavras são pouco para expressar a minha gratidão. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos meus avós maternos, Severina Marinho de Sales (*in memoriam*) e José Marreiro de Sales, que, apesar de todas as dificuldades, me ajudaram em absolutamente todos os momentos. Vó Severina, sinto tanto a sua falta. Você partiu para o descanso eterno e ficou um vazio tão grande, uma dor que não tem fim. Vô Marreiro, meu avô, meu pai, meu amigo, meu alicerce, a minha felicidade é ver a sua felicidade. Meus avós maternos, o amor que sinto por vocês é infinito. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos meus avós paternos, Maria do Carmo de Farias (*in memoriam*) e Manoel Sabino da Silva. Vó Carminha, não há adeus mais difícil do que aquele que sabemos que é para sempre. O seu adeus foi um desse, deixou tanta saudade que não cabe em meu coração. Vô Manoel, homem forte, íntegro e generoso, sinto o maior orgulho em ter o senhor como avô. Meus avós paternos, tenho imensa gratidão a vocês. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Gabriel de Sales Hildebrand, Jennifer de Jesus Tanaka e José Ednaldo da Silva. Meus irmãos, a nossa família é o nosso maior tesouro. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos meus tios maternos, José Marcelino de Sales, Maria Cleide de Sales Andrade, Maria das Dores Sales da Costa, Maria do Socorro Sales, Vera Lúcia de Sales e seus respectivos cônjuges. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos meus tios paternos, Adeilda Manoel da Silva de Araújo, Adeildo Manoel da Silva, Edivânia Manoel da Silva Carvalho, Gerson Manoel da Silva Souza, Josimar Manoel da Silva (*in memoriam*), Josineide Farias da Silva Souza, Vanderleia Antônia da Silva e seus respectivos cônjuges. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Às minhas primas Gerlane Maria da Silva Santos e Jacinta Lúcia Honório da Silva. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos meus padrinhos, Maria de Lourdes da Silva Agostinho e Antônio Luiz Agostinho. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Ao meu namorado, Jefferson Santos Gonçalves, pelo companheirismo, amor e atenção. Obrigado por ser tão presente em minha vida e me incentivar a não desistir dos meus sonhos! Amo você!

À José Carlos da Silva (Zé Carlos) e a Maria Bernadete dos Santos (Dedé) pelo apoio, carinho e incentivo que recebi quando me mudei para a cidade de João Pessoa. Obrigado por tudo! Amo vocês!

A todos os meus amigos, em especial à Alessandro Ramos de Brito Oliveira, a Antônio dos Santos Sabino, a Danilo Félix Araújo (Dan), a Emanuele Cardoso Dias (Manu), a Francisco Érick de Oliveira, a Gérsia Gonçalves de Melo, a Jonathan de Holanda Santana, a José Cláudio da Silva (Seu Cláudio), a Josefa Domícia da Silva (Jô), a Jucilene Pereira de Sousa, a Maria José de Andrade Silva, a Mayara Monique Almeida Moura Nunes, a Raíssa Mayane de Sousa Bezerra, a Rárisson Leno da Silva (Raro), a Renally Barbosa da Silva, a Teresa Renally Monteiro da Silva, a Wesley Moura dos Santos, a William Gustavo da Silva Macedo e a Wilson de Lima Domingos, que, ao longo desses anos, se tornaram também minha família. Obrigado por acreditar em mim e me ajudar a ser uma pessoa melhor. Amo vocês!

À minha professora orientadora, Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas. “Profa.” (como costume chamá-la), você ensinou muito mais que fazer artigos e experimentos científicos, ensinou a fazer ciência. Obrigado por todo o apoio, conselhos e paciência!

Ao meu professor coorientador, Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes. Obrigado por toda a contribuição e o empenho durante a elaboração dessa tese de doutorado!

Aos professores ingredientes da banca examinadora, Profa. Dra. Fabiola da Cruz Nunes, Profa. Dra. Janeusa Trindade de Souto, Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam e Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente. Obrigado pela disponibilidade e contribuição científica!

Aos funcionários da UFPB, em especial ao Reitor Prof. Dr. Valdiney Veloso Gouveia e a Vice-reitora Profa. Dra. Liana Filgueira Albuquerque. Obrigado por proporcionarem um ambiente propício para o desenvolvimento dessa tese de doutorado!

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, em especial aos coordenadores Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira e as secretárias Me. Caroline Helena Meireles de Medeiros Manguiera e Nilmar Nincia Neves de Medeiros. Obrigado por toda a assistência!

Aos professores do PgPNSB do CCS da UFPB, em especial à Profa. Dra. Bagnólia Araújo Costa, a Profa. Dra. Leônia Maria Batista, a Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral, o Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, o Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, o Prof. Dr. Josean Fachine Tavares e o Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida. Obrigado por todo o aprendizado!

Aos funcionários do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB, em especial à Dr. Roberta Nunes Parentoni e a José Crispim Duarte. Obrigado por todo apoio prestado!

Aos funcionários terceirizados da UFPB, em especial à Mônica Rodrigues da Silva. Obrigado!

Aos membros do Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB, em especial aos coordenadores Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam, Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas, Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira e Prof. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos. Obrigado!

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa, Dr. José Guilherme Ferreira Marques Galvão, Dr. Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva, Dra. Juliane Santos de França da Silva, Me. Deyse Cristina Madruga Carvalho e Me. Éssia de Almeida Lima. Obrigado por toda a ajuda!

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do CBiotec da UFPB, em especial ao Prof. Dr. Isac Almeida De Medeiros e a Dra. Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo. Obrigado!

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do CBiotec da UFPB, em especial ao Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo. Obrigado!

Aos membros do Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR) do CBiotec da UFPB, em especial ao Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral. Obrigado!

Aos funcionários da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em especial ao Reitor Prof. Dr. Danilo Giroldo e o Vice-reitor Prof. Dr. Renato Duro Dias. Obrigado por todo o apoio!

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório de Cultura Celular (LCC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da FURG, em especial à Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto e Profa. Dra. Aline Portantiolo Lettnin. Obrigado por todo o suporte!!

À Tainã Figueiredo Cardoso. Obrigado pela ajuda no projeto dos iniciadores!

À Profa. Dra. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek, professora emérita da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Obrigado por todo o carinho e inspiração!

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Obrigado pelo fomento!

Porque ninguém faz um trabalho sozinho, muito obrigado!

Todas as substâncias são venenos, não existe uma que não seja um veneno; somente a dose diferencia um veneno de um remédio (PARACELSUS, 1965, v. 1538, p. 510, tradução nossa).

A imaginação muitas vezes nos leva a mundos que nunca existiram. Mas, sem ela, nós não vamos a lugar algum (SAGAN, 1985, p. 10, tradução nossa).

RESUMO

A patulina (PAT) é um produto natural derivado de fungos com propriedades imunossupressoras. No entanto, as vias de sinalização envolvidas no efeito da PAT permanecem indefinidas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da PAT em macrófagos peritoneais murinos ativados com lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, macrófagos peritoneais murinos foram estimulados com LPS e tratados com a PAT em diferentes concentrações (62,5-4.000 ng/ml). O ensaio de viabilidade celular mostrou que a PAT em concentrações de até 250 ng/ml não afetou a viabilidade dos macrófagos. Então, foi avaliada a produção de óxido nítrico usando as concentrações não tóxicas de PAT (62,5; 125 e 250 ng/ml). Como resultado, a PAT, na concentração de 250 ng/ml, reduziu significativamente a produção do óxido nítrico (98,4%), a expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS; 83,5%) e a expressão do ácido ribonucleico mensageiro da iNOS (100,0%) nas células estimuladas com o LPS. Em seguida, foi investigado se a PAT interfere na produção de interleucina (IL) 1 β , IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . A PAT reduziu significativamente a produção da IL-1 β (80,6%) induzida pelo LPS, sem interferir na produção da IL-6, IL-10 e TNF- α . Além disso, a PAT reduziu significativamente a expressão das proteínas grupamento de diferenciação (CD) 69 (63,1%) e receptor do tipo *Toll* (TLR) 4 (91,9%) na presença do LPS, sem alterar a expressão gênica dessas proteínas. Por fim, para investigar o mecanismo de ação da PAT, foi realizada a análise da fosforilação das proteínas ativadas por mitógenos (MAP) quinases. A PAT reduziu significativamente a fosforilação induzida pelo LPS de todas as MAP quinases avaliadas: quinase regulada por sinal extracelular (ERK; 89,5%), quinase N-terminal c-Jun (JNK; 77,5%) e p38 (72,3%). Em conjunto, esses dados inéditos sugerem que a PAT regula negativamente a resposta inflamatória aguda, inibindo a produção de óxido nítrico ao suprimir a via de sinalização CD69-TLR4/MAP quinases ERK-JNK-p38/Nos2/iNOS em macrófagos peritoneais murinos. Assim, a PAT pode se tornar uma ferramenta farmacológica promissora para o controle da inflamação, capaz de inibir completamente a via do óxido nítrico.

Palavras-chave: 4-hidroxi-4H-furo(3,2-C)-piran-2(6H)-ona. Clavacina. Macrófagos. Inflamação aguda.

ABSTRACT

Patulin (PAT) is a fungi-derived natural product with immunosuppressive properties, but the signaling pathways involved in the effect of PAT remain undefined. This work aimed to evaluate the effect of PAT in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine peritoneal macrophages. For this purpose, murine peritoneal macrophages were stimulated with LPS and treated with PAT at different concentrations (62.5-4,000 ng/ml). Cell viability assay showed that PAT at concentrations up to 250 ng/ml did not affect macrophage viability. Then, nitric oxide response was evaluated using the nontoxic PAT concentrations (62.5; 125; and 250 ng/ml). As a result, PAT, at concentration of 250 ng/ml, significantly reduced nitric oxide production (by 98.4%), inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression (by 83.5%), and iNOS messenger ribonucleic acid expression (by 100.0%) in the cells stimulated with LPS. Next, we investigated whether PAT interferes with interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- α release. PAT significantly reduced LPS-induced IL-1 β release (by 80.6%), without interfering with the production of IL-6, IL-10, and TNF- α . Moreover, PAT significantly reduced cluster of differentiation (CD) 69 (by 63.1%) and Toll-like receptor (TLR) 4 (by 91.9%) protein expression in the presence of LPS, without altering the gene expression of these proteins. Finally, to investigate PAT mechanism of action, mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation analysis was performed. PAT significantly reduced LPS-triggered phosphorylation of all MAP kinases assessed: extracellular signal-regulated kinase (ERK; by 89.5%), c-Jun N-terminal kinase (JNK; by 77.5%), and p38 (by 72.3%). Taken together, these data suggest that PAT downregulates acute inflammatory response, inhibiting nitric oxide production by suppressing CD69-TLR4/ERK-JNK-p38 MAP kinases/*Nos2*/iNOS signaling pathway in murine peritoneal macrophages. Thus, PAT could become a promising pharmacological tool for the control of inflammation, capable of completely inhibiting the nitric oxide pathway.

Keywords: 4-hydroxy-4H-furo(3,2-C)-pyran-2(6H)-one. Clavacin. Macrophages. Acute inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da PAT	24
Figura 2 – Principais respostas funcionais dos macrófagos.....	35
Figura 3 – Via de sinalização LPS/TLR4/MAP quinases	39
Figura 4 – Resumo gráfico do protocolo de isolamento de macrófagos peritoneais murinos	47
Figura 5 – Resumo gráfico do protocolo de ensaio de viabilidade celular usando o reagente MTT	48
Figura 6 – Resumo gráfico do protocolo de determinação da produção de óxido nítrico usando a solução de Griess	49
Figura 7 – Resumo gráfico do protocolo de determinação da produção de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α por ELISA.....	50
Figura 8 – Resumo gráfico do protocolo de quantificação da expressão do mRNA do CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS por RT-qPCR.....	52
Figura 9 – Resumo gráfico do protocolo de avaliação da expressão de CD69, iNOS e TLR4 e da fosforilação das MAP quinases ERK, JNK2 e p38 por citometria de fluxo	53
Figura 10 – Efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos.....	56
Figura 11 – Efeito da PAT na produção de óxido nítrico	58
Figura 12 – Efeito da PAT na expressão das proteínas CD69, iNOS e TLR4.....	59
Figura 13 – Efeito da PAT na expressão do mRNA que codifica as proteínas CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS.....	61
Figura 14 – Efeito da PAT na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α	63
Figura 15 – Efeito da PAT na fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38	65
Figura 16 – Patulina inibe a produção de óxido nítrico induzida por LPS ao suprimir a via de sinalização das MAP quinases	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
BCR	Receptor de célula B
CAPES	Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CD	Grupamento de diferenciação
CD121a	Receptor de interleucina-1 do tipo 1
CD121b	Receptor de interleucina-1 do tipo 2
CD126	Receptor de interleucina-6
CD130	Glicoproteína 130
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Cicloxygenase
d.C.	Depois de Cristo
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
gp130	Glicoproteína 130
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
IL-1R1	Receptor de interleucina-1 do tipo 1
IL-1R2	Receptor de interleucina-1 do tipo 2
IL-1R3	Receptor de interleucina-1 do tipo 3
IL-6R	Receptor de interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida

IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina-1
JNK	Quinase N-terminal c-Jun
LBP	Proteína de ligação ao lipopolissacarídeo
LCC	Laboratório de Cultura Celular
LIMFA	Laboratório de Imunofarmacologia
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetição rica em leucina
MAP	Proteína ativada por mitógeno
MD-2	Proteína de diferenciação mielóide 2
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MYD88	Adaptador de transdução de sinal imunológico inato MYD88
NF	Fator nuclear
NOS	Óxido nítrico sintase
ONCOFAR	Laboratório de Oncofarmacologia
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PAT	Patulina
PBS	Tampão fosfato-salino
PgPNSB	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RT	Transcrição reversa
SEM	Erro padrão da média
TCR	Receptor de célula T
THD	Domínio de homologia ao fator de necrose tumoral
TIR	Receptor de Toll/interleucina-1
TIRAP	Proteína adaptadora contendo o domínio receptor de <i>Toll</i> /interleucina-1
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAF	Fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1	Patulina.....	24
2.2	Imunidade.....	26
2.3	Breve histórico da Inflamação	28
2.4	Origem e classificação dos macrófagos	32
2.5	Principais funções efetoras dos macrófagos.....	34
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo geral.....	43
3.2	Objetivos específicos	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Local da realização dos experimentos	45
4.2	Reagentes.....	45
4.3	Animais.....	46
4.4	Isolamento de macrófagos peritoneais murinos	46
4.5	Efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos	48
4.6	Efeito da PAT na produção de óxido nítrico.....	48
4.7	Efeito da PAT na produção das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α	49
4.8	Efeito da PAT na expressão do mRNA que codifica as proteínas CD69, COX-2, IL-1β e iNOS.....	51
4.9	Efeito da PAT na expressão das proteínas CD69 e TLR4	53
4.10	Efeito da PAT na expressão da proteína iNOS e na fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38	54
4.11	Análise de dados de citometria de fluxo	54
4.12	Análise estatística.....	54
5	RESULTADOS	56
5.1	Efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos	56
5.2	Efeito da PAT na produção de óxido nítrico.....	58
5.3	Efeito da PAT na expressão das proteínas CD69, iNOS e TLR4.....	59
5.4	Efeito da PAT na expressão do mRNA que codifica as proteínas CD69, COX-2, IL-1β e iNOS.....	61
5.5	Efeito da PAT na produção das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α	63

5.6	Efeito da PAT na fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38.....	65
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A – CERTIFICADO Nº 105/2016	96
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF PYOCYANIN IN LPS- STIMULATED MURINE MACROPHAGES”	97
	APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “C-PHYCOCYANIN TO OVERCOME THE MULTIDRUG RESISTANCE PHENOTYPE IN HUMAN ERYTHROLEUKEMIAS WITH OR WITHOUT INTERACTION WITH ABC TRANSPORTERS”	98
	APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “MORITA-BAYLIS-HILLMAN ADDUCT 2-(3-HYDROXY-2- OXOINDOLIN-3-YL)ACRYLONITRILE (ISACN) MODULATES INFLAMMATORY PROCESS <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> ”	99
	APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “MUCH MORE THAN A CARDIOTONIC STEROID: MODULATION OF INFLAMMATION BY OUABAIN”	100
	APÊNDICE F – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “NEUTROPHILS AND COVID-19: THE ROAD SO FAR”	101
	APÊNDICE G – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “PATULIN INHIBITS LPS-INDUCED NITRIC OXIDE PRODUCTION BY SUPPRESSING MAPKS SIGNALING PATHWAY”	102
	APÊNDICE H – CAPÍTULO DE LIVRO INTITULADO “PACIENTE DIABÉTICO: UM CUIDADO MULTIPROFISSIONAL”	103
	APÊNDICE I – CAPÍTULO DE LIVRO INTITULADO “PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS”	104
	APÊNDICE J – ORGANIZAÇÃO DE LIVRO INTITULADO “AQUI SE FAZ CIÊNCIA! PESQUISAS DESENVOLVIDAS EM UNIVERSIDADES FEDERAIS E SUAS APLICABILIDADES PARA A SOCIEDADE”	105
	APÊNDICE K – PATENTE INTITULADA “OUABAÍNA COMO INIBIDOR DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS”	106

APÊNDICE L – PATENTE INTITULADA “PATULINA PARA TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO”	107
APÊNDICE M – PATENTE INTITULADA “UTILIZAÇÃO DO ADUTO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN DERIVADO DA ISATINA ISACN PARA O TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO”	108
APÊNDICE N – RESUMO APRESENTADO EM EVENTO CIENTÍFICO INTERNACIONAL INTITULADO “ROLE OF C-PHYCOCYANIN FROM <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> ON HUMAN ERYTHROLEUKEMIC CELLS RESISTANT TO MULTIPLE DRUGS”	109

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são compostos enriquecidos, isolados e sintetizados a partir de ou baseados em fontes naturais (ATANASOV *et al.*, 2021; CHOPRA; DHINGRA, 2021; TALMADGE, 2016). As principais fontes de produtos naturais são as plantas, os animais e os microrganismos (BILLS; GLOER, 2016). A patulina (PAT) é um produto natural derivado de fungos produzido por mais de 30 gêneros, compreendendo mais de 60 espécies (MOAKE; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2005). A PAT foi originalmente descrita por Birkinshaw *et al.* (1943) e Raistrick (1943) como um antibiótico isolado do fungo *Penicillium patulum*. Além da ação antibacteriana, a PAT possui propriedades imunossupressoras que abrangem a ativação do fator nuclear (NF)- κ B (TSAI *et al.*, 2016), a função efetora de leucócitos (OH *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2015b; OZSOY *et al.*, 2008), a produção de citocinas (OH *et al.*, 2015a; TSAI *et al.*, 2016), a produção de espécies reativas de oxigênio (BOURDIOL; ESCOULA; SALVAYRE, 1990), a produção de óxido nítrico (TSAI *et al.*, 2016), a resposta imunológica humoral (ESCOULA *et al.*, 1988a; ESCOULA *et al.*, 1988b) e o processo de fagocitose (BOURDIOL; ESCOULA; SALVAYRE, 1990; OH *et al.*, 2015a). No entanto, as vias de sinalização envolvidas no efeito da PAT permanecem indefinidas.

A detecção inicial dos estímulos nocivos é mediada por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que reconhecem padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). A família PRR inclui vários receptores, como os receptores do tipo *Toll* (TLRs). A família TLR compreende receptores integrais de membrana do tipo I que contêm um domínio de sinalização intracelular, uma hélice transmembrana e um domínio extracelular responsável pelo reconhecimento dos DAMPs e PAMPs (BEHZADI; GARCIA-PERDOMO; KARPINSKI, 2021; PARK; LEE, 2013). Na presença do lipopolissacarídeo (LPS), um PAMP bacteriano, o TLR4 ativa vias de sinalização intracelular, como as proteínas ativadas por mitógenos (MAP) quinases, que, então, ativam fatores de transcrição que induzem a expressão de genes relacionados à inflamação, como o gene *Nos2* (RAMACHANDRAN; LUPFER; ZAKI, 2018). O gene *Nos2* codifica a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), responsável pelas altas concentrações de óxido nítrico durante a inflamação. O óxido nítrico possui várias funções fisiológicas, em especial como agente microbicida

(MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; MONCADA, 1999). Outra enzima também importante durante a inflamação é a cicloxigenase (COX) 2, que atua em sinergia com a iNOS (SOROKIN, 2016). A COX-2 produz mediadores pró-inflamatórios chamados prostanoídes a partir do ácido araquidônico e, dessa forma, contribui para a progressão da inflamação (WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000). De forma semelhante, o aumento de outros mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), também contribuem para a progressão da inflamação (DE MARIA *et al.*, 1994; MARZIO *et al.*, 1997).

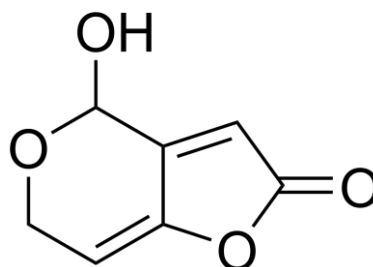
Apesar de ser considerada uma resposta de defesa do organismo, a inflamação pode se tornar patológica quando desregulada, sendo um fator determinante para o desenvolvimento de muitas doenças (ARULSELVAN *et al.*, 2016). Nesse contexto, os macrófagos possuem funções bem estabelecidas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, 2020; ROSS; DEVITT; JOHNSON, 2021). Considerando que pouco se sabe sobre as vias de sinalização envolvidas nos efeitos desencadeados pela PAT, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel da PAT no processo inflamatório agudo utilizando o modelo de macrófagos peritoneais murinos ativados por LPS.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Patulina

A PAT, 4-hidroxi-4H-furo(3,2-C)-piran-2(6H)-ona (Figura 1), é uma lactona produzida por várias espécies de fungos, especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Byssochlamys* e *Penicillium* (MAHATO *et al.*, 2021; MOAKE; PADILLA-ZAKOUR; WOROBO, 2005; PUEL; GALTIER; OSWALD, 2010). O *P. expansum* é o principal produtor, capaz de sintetizar até 1 g de PAT/kg de substrato (FRANK, 1977).

Figura 1 – Estrutura química da PAT.



Fonte: Sigma-Aldrich® (2021).

A PAT foi inicialmente observada e nomeada por Birkinshaw *et al.* (1943) e Raistrick (1943), que purificavam, isolavam e determinavam a estrutura química de compostos derivados de fungos, seguindo o entusiasmo da descoberta da penicilina pelo britânico Alexander Fleming em 1928 (Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1945) (HARINGTON, 1949). Ela foi originalmente isolada a partir de filtrados de culturas de *P. patulum*, sinônimo heterotípica de *P. griseofulvum*, mostrando atividade antibacteriana na triagem inicial. Logo após, uma amostra da PAT foi enviada ao Dr. William Ewart Gye, que estava com um severo resfriado e, sabendo da atividade antibacteriana da substância tanto contra bactérias Gram-negativas, decidiu testá-la em si mesmo. O resultado foi satisfatório o suficiente para ele testá-la em outros membros de sua equipe. Os resultados, mais uma vez promissores, justificaram uma extensão dos estudos de triagem para uma série de experimentos controlados apoiados por outros estudiosos. O resultado desse estudo colaborativo foi detalhado por Birkinshaw *et al.* (1943), que mostrou possibilidades clínicas para o uso da PAT. Além disso, foram feitos acordos com o *Therapeutic Research Corporation*, localizado

na ilha da Grã-Bretanha, para produção da substância antibacteriana para outras triagens, as quais incluíam ensaios para a determinação da curva de dose-resposta, além de ensaios toxicológicos, essenciais para a liberação do uso da substância (RAISTRICK, 1943). Mais tarde, em 1948, os ensaios clínicos com a PAT, que, nesta etapa, recebeu o nome de tercinina, foram iniciados pelo *British Medical Research Center* (CHALMERS; CLARKE, 2004; PUEL; GALTIER; OSWALD, 2010).

Além da atividade antibacteriana, a PAT possui atividade imunossupressora, abrangendo várias células do sistema imunológico, como os macrófagos. Oh *et al.* (2015a) mostraram que a PAT reduziu a atividade fagocitária de macrófagos bovinos, um dos principais mecanismos do sistema imunológico inato contra microrganismos (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017). Além disso, Bourdiol, Escoula e Salvayre (1990) mostraram que a PAT reduziu a atividade microbicida, fusão de fagossomo com lisossomo e produção de enzimas lisossômicas em macrófagos peritoneais murinos. Essas etapas são fundamentais para o amadurecimento do fagossomo e, conseqüentemente, destruição do microrganismo ingerido (GORDON, 2016; HALLETT, 2020; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2017).

Ainda nesse contexto, Tsai *et al.* (2016) mostraram que a PAT suprimiu a resposta imunológica inata ao inibir a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos RAW264.7. Além disso, Bourdiol, Escoula e Salvayre (1990) demonstraram que a PAT reduziu a produção de superóxido em macrófagos peritoneais murinos e Escoula *et al.* (1988b) observaram que a PAT reduz a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos peritoneais de rato, efeito que não repetiu em macrófagos bovinos (OH *et al.*, 2015a). De fato, a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio é o principal mecanismo efetor que os fagócitos usam para matar microrganismos, corroborando a PAT como um agente imunossupressor capaz e suprimir parte da resposta imunológica inata (AL-SHEHRI, 2021).

A ação imunossupressora da PAT em macrófagos se estende além da fagocitose, abrangendo também a expressão de citocinas, como IL-6 (TSAI *et al.*, 2016), IL-10, IL-23 e fator transformador do crescimento- β (OH *et al.*, 2015a). Por fim, apesar de as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito imunossupressor da PAT terem sido pouco estudadas até o momento, Tsai *et al.* (2016) mostrou que a supressão da resposta imunológica inata após o tratamento com a PAT envolve a participação da via do NF- κ B, a qual é suprimida na presença da PAT.

2.2 Imunidade

A palavra imunidade é derivada do latim *immunitas*, que se refere à proteção contra processos legais oferecida a senadores romanos durante seus mandatos. Na imunologia, o termo imunidade representa um estado de proteção do organismo contra doenças, especialmente aquelas causadas por patógenos (chamadas doenças infecciosas) (BERGMAN, 2007).

A história da imunidade teve início durante a Guerra do Peloponeso, que ocorreu na Grécia Antiga entre 431 e 404 antes de Cristo (a.C.). Em 430 a.C., a cidade de Atenas, que estava em guerra com a cidade de Esparta, foi atingida por uma praga (chamada praga de Atenas). A epidemia durou 4 anos (430-426 a.C.) e foi responsável pela morte de 25% da população local. No mesmo período, o historiador e general ateniense Thucydides, que contraiu e sobreviveu à praga, descreveu, na obra *History of the Peloponnesian War*, que os sobreviventes se tornavam protegidos contra a doença, o primeiro relato da imunidade (THUCYDIDES; FINLEY, 1954). Os sistemas, órgãos, tecidos, células e moléculas responsáveis por essa proteção formam o sistema imunológico, que pode ser didaticamente dividido em sistema imunológico inato e adaptativo, responsáveis pelas respostas iniciais da imunidade inata e tardias da imunidade adaptativa, respectivamente (DELVES; ROITT, 2000).

A infecção é detectada por meio do reconhecimento de estruturas exógenas evolutivamente conservadas presentes nos patógenos (chamadas PAMPs). Essas estruturas são produzidas durante todo o ciclo de vida do patógeno, sendo essenciais para a sua patogenicidade e sobrevivência. Além disso, os PAMPs são compartilhados por grupos de patógenos relacionados (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; RAI; AGRAWAL, 2017; RAJAEI; BARNETT; CHEADLE, 2018). Por exemplo, as bactérias Gram-negativas compartilham o LPS em sua membrana externa (KUZMICH *et al.*, 2017; MENG; LOWELL, 1997; RAETZ; WHITFIELD, 2002), enquanto as bactérias Gram-positivas compartilham o ácido lipoteicoico. Dessa forma, a resposta imunológica inata é semelhante para patógenos que pertencem a um mesmo grupo (GINSBURG, 2002; PERCY; GRÜNDLING, 2014).

Os PAMPs são reconhecidos por PRRs expressos em leucócitos e outros tipos celulares, como células epiteliais e fibroblastos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; BHATTACHARYYA *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2015). Esses receptores são codificados por genes herdados (linhagem germinativa) e, consequentemente,

apresentam uma diversidade limitada, ou seja, há um número finito de receptores pertencentes a poucas famílias responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Adicionalmente, os PRRs também reconhecem moléculas endógenas liberadas durante estresse ou dano celular (chamadas DAMPs ou alarminas) (BROGGI; GRANUCCI, 2015). Assim, além de reconhecer e responder a infecções, o sistema imunológico é capaz de reconhecer e responder a lesões estéreis (RIDER *et al.*, 2017; YANG; HAN; OPPENHEIM, 2017).

Os componentes do sistema imunológico inato estão em vigor mesmo antes da infecção e preparados para responder rapidamente a ela (KAUR; SECORD, 2021; ROMO; PEREZ-MARTINEZ; FERRER, 2016). Dessa forma, o sistema imunológico inato é capaz de rapidamente desenvolver uma resposta imunológica e criar um ambiente inflamatório que contribui para a eliminação da infecção, restaurando a homeostase do organismo (KAUR; SECORD, 2021; NEWTON; DIXIT, 2012).

Em contraste ao sistema imunológico inato, o sistema imunológico adaptativo reconhece e responde a diferentes substâncias com alta especificidade. Além disso, a exposição do sistema imunológico adaptativo a uma determinada substância aumenta a sua capacidade de responder novamente àquela substância. Assim, as respostas imunológicas adaptativas a uma segunda exposição ou exposições subsequentes a mesma substância (chamadas respostas imunológicas secundárias) são, em geral, mais rápidas e mais robustas, quando comparadas à primeira resposta imunológica adaptativa àquela substância (chamada resposta imunológica primária) (BONILLA; OETTGEN, 2010; HOSSEINI *et al.*, 2020; MORAES-PINTO; SUANO-SOUZA; ARANDA, 2021).

A alta especificidade do sistema imunológico adaptativo no reconhecimento de substâncias é resultado da diversidade dos receptores expressos nos linfócitos B e linfócitos T, chamados receptores de célula B (BCRs) e receptores de célula T (TCRs), respectivamente, e da diversidade dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B. Nesse contexto, as substâncias que elicitam respostas imunológicas após se ligarem especificamente a um BCR, TCR ou anticorpo são chamadas antígenos e as partes de tais antígenos que são especificamente reconhecidas são chamadas determinantes antigênicos ou epítopos (YATIM; LAKKIS, 2015).

Existem muitas conexões entre o sistema imunológico inato e o sistema imunológico adaptativo. Por exemplo, para que uma resposta imunológica adaptativa seja iniciada, é necessário que os antígenos sejam capturados, processados e

expostos aos linfócitos T específicos para àquele antígeno por meio de um processo chamado apresentação de antígenos, o qual é realizado por células do sistema imunológico inato chamadas células apresentadoras de antígenos (APCs) (FARZI *et al.*, 2022; HARDING; CANADAY; RAMACHANDRA, 2010). Dessa forma, além de fornecer a primeira linha de defesa do organismo, o sistema imunológico inato desempenha um papel fundamental na ativação e regulação do sistema imunológico adaptativo (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; MORAES-PINTO; SUANO-SOUZA; ARANDA, 2021). Além disso, o reconhecimento de antígenos mediado por esse conjunto de receptores determina a origem e o tipo da infecção, assim o sistema imunológico responde com os mecanismos efetores mais apropriados para cada tipo de infecção (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

2.3 Breve histórico da Inflamação

O termo inflamação é derivado do latim *inflammare*, que significa incendiar (RIVAS, 2010). A história do estudo da inflamação teve início no século XXX a.C. e preparou o caminho para o entendimento atual desse processo. Os primeiros relatos sobre a inflamação são de um papiro egípcio datado de 3.000 anos a.C. que continha descrições detalhadas da anatomia e fisiologia humana, além de numerosas formulações medicamentosas (ELGAZZAR, 2006).

No século I depois de Cristo (d.C.), o escritor romano Aulus Cornelius Celsus descreveu, no quarto capítulo do livro *De Re Medica* (nome pelo qual a sua obra ficou conhecida na tradução em latim), os quatro primeiros sinais clínicos da inflamação (também chamados sinais cardinais da inflamação): aquecimento (do latim, *calor*), dor (do latim, *dolor*), inchaço (do latim, *tumor*) e vermelhidão (do latim, *rubor*). Foi a primeira documentação dos sinais cardinais da inflamação e representa o que conhecemos hoje como inflamação aguda (BENAROYO, 1994; ROSENTHAL, 1961; SCOTT *et al.*, 2004).

No século III d.C., o físico grego Claudius Galenus descreveu a inflamação, especialmente o pus, como uma resposta benéfica do organismo envolvida no reparo de feridas. Uma visão humoral da inflamação que repercutiu até o século XIX d.C. Mais à frente, no século XVIII d.C., o cirurgião escocês John Hunter também correlacionou a inflamação como uma resposta benéfica para o organismo (ROCHA E SILVA, 1978; SCOTT *et al.*, 2004).

No século XIX d.C., a passagem dos leucócitos do sangue para o espaço extravascular através do endotélio (processo chamado diapedese ou transmigração) foi descrita de forma independente por três estudiosos, Henri Dutrochet em 1824, Augustus Waller em 1846 e Julius Cohnheim em 1867 (OKABE; MEDZHITOV, 2016). Mais tarde, em 1871, o médico prussiano Rudolf Ludwig Carl Virchow adicionou o quinto sinal cardinal da inflamação: perda de função (do latim, *functio laesa*) (BENAROYO, 1994; BROWN; FEE, 2006; SCOTT *et al.*, 2004). Em contraste com Galen e Hunter, Virchow considerava a inflamação essencialmente patológica para o organismo (BENAROYO, 1994; SCOTT *et al.*, 2004).

Ainda no século XIX d.C., os métodos científicos começaram a ser usados no estudo da inflamação. Essa prática foi descrita por George Bernard Shaw na peça *The Doctor's Dilemma*:

[...] lembre-se de que você tem uma teoria científica sólida para correlacionar suas observações à beira da cama. Mera experiência por si só não é nada. Se eu levar meu cachorro para o lado da cama comigo, ele vê o que eu vejo [...], mas ele não aprende nada disso. Por quê? Porque ele não é um cachorro científico (SHAW, 1911, ato I, p. 110, tradução nossa).

No século XX d.C., em 1908, o biólogo russo Élie Metchnikoff descobriu o processo de fagocitose e definiu a inflamação como a emigração dos leucócitos, especialmente os fagócitos, da corrente sanguínea para o tecido infectado, onde englobam e destroem os patógenos (TRAVIS, 2009). Esse conceito também foi satirizado por Shaw na peça *The Doctor's Dilemma*:

[...] as drogas só podem reprimir sintomas. O verdadeiro remédio para todas as doenças é o remédio da natureza. A natureza e a ciência são um só. A natureza forneceu nos corpúsculos brancos como você os chamam – fagócitos como nós os chamamos – um meio natural de devorar e destruir todos os germes de doenças. Há no fundo apenas um tratamento científico genuíno para todas as doenças, e isso é estimular os fagócitos. As drogas são uma ilusão. Encontre o germe da doença, prepare uma antitoxina adequada dele; injete três vezes por dia quinze minutos antes das refeições e qual é o resultado? Os fagócitos são estimulados; eles devoram a doença; e o paciente se recupera – a menos que, é claro, ele esteja longe demais (SHAW, 1911, ato I, p. 112, tradução nossa).

Em 1927, o cardiologista britânico Thomas Lewis descobriu que uma substância, a histamina, era liberada da pele em muitas formas de lesão tecidual, sendo considerada o mediador comum da chamada resposta tripla. A resposta tripla de Lewis corresponde a uma resposta cutânea que ocorre a partir de movimentos firmes

(fricção) na pele. A fricção na pele produz uma linha vermelha inicial, seguida por um alargamento ao redor dessa linha e, finalmente, uma pápula. Lewis foi o primeiro a caracterizar fisiologicamente as alterações vasculares da inflamação. Além disso, Lewis foi o primeiro a reconhecer a inflamação neurogênica (LEWIS, 1927). Mais tarde, em 1978, o médico brasileiro Maurício Oscar da Rocha e Silva definiu bioquimicamente a inflamação como:

O fenômeno multimediado, de um tipo de padrão no qual todos os mediadores entrariam e sairiam no momento apropriado para desempenhar seus papéis no aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de leucócitos, dor, formação de edema local e necrose, no qual a predominância de qualquer um seria fortuita ou dependente de suas capacidades específicas de produzir sintomas, alguns diretamente, alguns indiretamente e alguns por potencialização ou liberação de outros agentes (ROCHA E SILVA, 1978, v. 8, n. 1-2, p. 48-49, tradução nossa).

Atualmente, a inflamação pode ser didaticamente dividida em duas formas, aguda e crônica (WEISS, 2008). A inflamação aguda é uma resposta imunológica de curta duração, minutos, horas ou alguns dias, que pode ser elicitada por diferentes estímulos nocivos, como as infecções e as lesões teciduais (RAI; AGRAWAL, 2017; RAJAEI; BARNETT; CHEADLE, 2018). Suas principais características são o infiltrado de leucócitos e o edema local, formado pela exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, juntamente com o acúmulo de células e detritos celulares (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; VARELA *et al.*, 2018).

A resposta inflamatória aguda é iniciada pelo reconhecimento de DAMPs e/ou PAMPs por PRRs expressos em leucócitos residentes. Esses receptores estão ligados a vias de transdução de sinal intracelulares que controlam a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas quimiotáticas (quimiocinas) e as citocinas pró-inflamatórias. As quimiocinas estimulam o movimento dos leucócitos ao longo do gradiente de concentração da quimiocina em direção à sua fonte (processo chamado quimiocinese), enquanto as citocinas pró-inflamatórias, como as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , juntamente com os DAMPs e PAMPs, ativam as células endoteliais, passam a expressar selectinas na superfície luminal (FITZNER *et al.*, 2008; VARELA *et al.*, 2018).

No sítio da inflamação, a permeabilidade dos capilares e vênulas a fluidos e proteínas plasmáticas aumenta e o fluxo sanguíneo para o tecido inflamado fica mais lento, devido à dilatação arteriolar. Como resultado, os leucócitos, maiores que as

hemácias, tendem a se mover para fora do eixo axial central do fluxo sanguíneo e mais próximo do revestimento do vaso sanguíneo (processo chamado marginação). A marginação dos leucócitos permite que as selectinas expressas na superfície luminal das células endoteliais se liguem a seus ligantes cognatos expressos nos leucócitos sanguíneos. Pelo fato das ligações selectina-ligante de selectina serem de baixa afinidade e possuírem alta taxa de desassociação, elas são facilmente rompidas pela força de cisalhamento do fluxo sanguíneo. Como resultado das repetidas associações e desassociações, os leucócitos rolam ao longo da superfície endotelial (HANLEY; WIRTZ; KONSTANTOPOULOS, 2004; KUNKEL; LEY, 1996; LEY *et al.*, 2007; MCEVER; CUMMINGS, 1997; MULLER, 2013; ROSEN, 2004; SUNDD *et al.*, 2011).

Ao mesmo tempo que os leucócitos rolam ao longo da superfície endotelial, as quimiocinas produzidas pelas células endoteliais e pelos leucócitos residentes são transportadas para a superfície luminal do endotélio, onde se ligam a glicosaminoglicanos de heparan sulfato presentes na face luminal das células endoteliais, fornecendo uma alta concentração local dessas quimiocinas, guiando o movimento dos leucócitos. Além disso, o reconhecimento dessas quimiocinas por seus receptores cognatos expressos nos leucócitos em rolamento ativa esses leucócitos (ALLEN; CROWN; HANDEL, 2007).

A ativação dos leucócitos induz o agrupamento de integrinas na superfície do leucócito, que, então, promove o aumento da avidéz das interações das integrinas com seus ligantes. Além disso, ocorrem modificações conformacionais nas integrinas que aumentam a afinidade dessas interações. O resultado desses eventos é uma adesão estável do leucócito à parede endotelial que permite a diapedese do leucócito (KIM; CARMAN; SPRINGER, 2003; KOMAROVA; MALIK, 2010; MULLER, 2013; WITTCHEN, 2009). Os leucócitos polimorfonucleares, especialmente os neutrófilos, são os primeiros a migrar. Posteriormente, os leucócitos mononucleares, como os linfócitos T e os monócitos/macrófagos, também são recrutados (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; VARELA *et al.*, 2018).

Quando a reposta imunológica elimina o estímulo inflamatório ou quando o estímulo inflamatório se esgota, a inflamação cessa e o tecido lesionado é substituído por um tecido parenquimatoso ou tecido conjuntivo (processo chamado cicatrização) (FILEP, 2013; FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Em alguns casos, a inflamação aguda pode persistir e progredir para a chamada inflamação crônica (ROCK *et al.*, 2010), um

processo de longa duração, mais longo que a inflamação aguda (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Suas principais características incluem a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) (COSTA; INCIO; SOARES, 2007), a síntese de matriz extracelular rica em colágeno (fibrose) (WYNN; RAMALINGAM, 2012), o infiltrado de linfócitos T e monócitos/macrófagos (WHITE; IQBAL; GREAVES, 2013), e o remodelamento tecidual (AOKI; NARUMIYA, 2012; HIROTA; MARTIN, 2013).

Contudo, embora possa se tornar patológica, a inflamação está entre os principais mecanismos efetores do sistema imunológico, sendo indispensável para a manutenção da homeostase do organismo. Sem ela, infecções poderiam não ser detectadas, feridas poderiam nunca cicatrizar e tecidos lesados permaneceriam como feridas não cicatrizadas permanentemente (AZEVEDO; LISBOA; RODRIGUES, 2020; BOWERS; FRANCO, 2020; NATHAN, 2002; WILKINSON; HARDMAN, 2020).

2.4 Origem e classificação dos macrófagos

Os macrófagos são uma população heterogênea de células do sistema imunológico amplamente distribuída em todos os órgãos e no tecido conectivo. Cada subpopulação apresenta cinética, funções e morfologia que variam de acordo com as necessidades de cada microambiente no qual ocorrem (TAKAHASHI, 2001; USHACH; ZLOTNIK, 2016).

A principal função dos macrófagos é englobar e destruir, por fagocitose, corpos estranhos, em especial os microrganismos; essa habilidade foi fundamental para a sua descoberta (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014; LOCATI; CURTALE; MANTOVANI, 2020; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). A história do estudo dos macrófagos teve início quando Metchnikoff, durante suas pesquisas realizadas no Instituto Pasteur, localizado na cidade de Paris, descreveu a presença de grandes células fagocíticas, as que chamou macrófagos, e células fagocíticas menores, as que chamou micrófagos, em tecidos de animais vertebrados e invertebrados. Metchnikoff demonstrou que esses fagócitos ingeriam e destruíam a maioria dos microrganismos invasores, desempenhando um papel importante na defesa do organismo contra infecções. Em 1892, Metchnikoff detalhou essas descobertas no livro *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation: faites à l'Institut Pasteur en avril et mai 1891* e introduziu o termo sistema de macrófagos (METCHNIKOFF, 1892).

Após a descoberta de Metchnikoff, foi estabelecido um intenso debate sobre os macrófagos, abrangendo temas como a sua origem e desenvolvimento. Logo, muitas teorias foram propostas para responder a essas questões. Em 1924, o físico e patologista alemão Karl Albert Ludwig Aschoff propôs o conceito de um sistema, o qual chamou sistema reticuloendotelial, composto por células com características endoteliais e reticulares e dotadas de capacidade fagocitária e incluiu os macrófagos nesse sistema. Para Aschoff, todas as células do sistema reticuloendotelial eram originadas a partir de células do tecido local (ASCHOFF, 1924).

Em 1925, um ano após Aschoff propor o sistema reticuloendotelial, a médica norte-americana Florence Rena Sabin e colaboradores discriminaram dois tipos distintos de células fagocíticas, os clasmatócitos (agora chamados macrófagos) e monócitos, em tecidos conjuntivos corados com corantes supravitais (SABIN, 1925). Em 1939, o também médico norte-americano Robert Higgins Ebert e o farmacologista e patologista australiano Howard Walter Florey, usando a mesma técnica de coloração, observaram que os monócitos migravam do sangue periférico para uma região lesionada (inflamada), se transformando em macrófagos (EBERT; FLOREY, 1939). Em 1948, o patologista japonês Shigeyasu Amano, também usando a coloração supravital, corroborou os monócitos sanguíneos como precursores dos macrófagos tanto em condições basais quanto em condições inflamatórias. Além disso, Amano acrescentou que os monócitos eram derivados de promonócitos, os quais eram derivados de monoblastos gerados a partir de progenitores na medula óssea (AMANO, 1948).

De fato, houve muitas tentativas de classificar os fagócitos mononucleares. Entretanto, numerosos estudos refutavam essas classificações. Em 1969, durante a *Conference on Mononuclear Phagocytes*, realizada na cidade de Leiden, um comitê propôs um novo sistema para os fagócitos mononucleares. Esse novo sistema (chamado sistema de fagócitos mononucleares) incluía os macrófagos nos tecidos e os monócitos e seus precursores na medula óssea. Em 1972, o sistema de fagócitos mononucleares foi revisado e novamente proposto, dessa vez pelo professor de medicina Ralph van Furth e colaboradores (VAN FURTH *et al.*, 1972). Atualmente, o sistema de fagócitos mononucleares inclui três tipos celulares: os monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e macrófagos teciduais residentes de vida longa (HUME; IRVINE; PRIDANS, 2019; MCGRATH; FRAME; PALIS, 2015).

No estado estável (homeostasia) em adultos e durante as reações inflamatórias, os macrófagos teciduais são derivados de monócitos sanguíneos que amadurecem na medula óssea e migram para os tecidos extravasculares, onde amadurecem ainda mais para formar macrófagos (DAVIES; TAYLOR, 2015; OKABE; MEDZHITOV, 2016). Os monócitos, por sua vez, são derivados de precursores comprometidos com a linhagem monocítica, os quais, por sua vez, são derivados de progenitores multipotentes mieloide-megacariócito-eritroide originados por autorrenovação ou a partir de células-tronco hematopoiéticas, as quais também são autorrenováveis (LI; HE; LI, 2019). O direcionamento para uma determinada linhagem celular é promovido por um conjunto de sinais, como as citocinas hematopoiéticas (também chamadas fatores estimuladores de colônia), característicos do microambiente hematopoiético (frequentemente chamado nicho) (LUCAS, 2017; WEI; FRENETTE, 2018). Já os macrófagos teciduais residentes de vida longa, como as células da micróglia (cérebro), as células de Kupffer (fígado), as células de Langerhans (epiderme) e os macrófagos alveolares (pulmão), são originados a partir de precursores presentes no saco vitelínico e no fígado fetal durante o desenvolvimento inicial e mantidos por autorrenovação (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

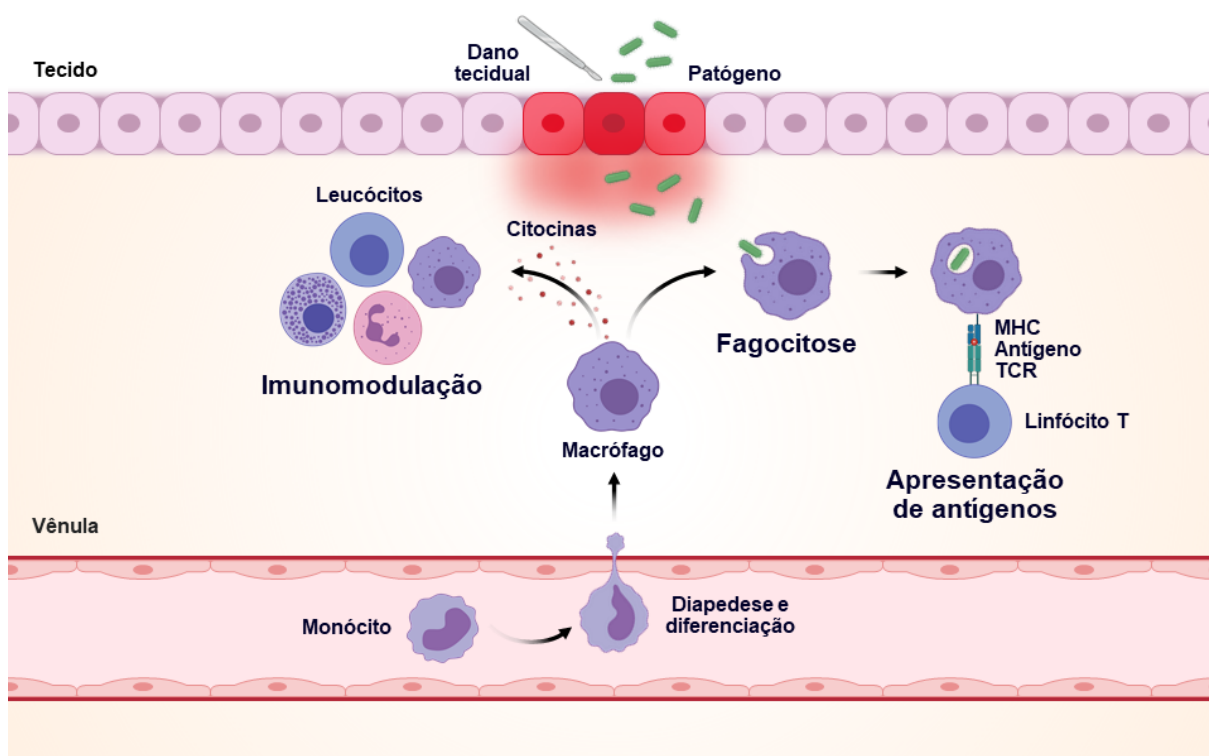
2.5 Principais funções efetoras dos macrófagos

Os macrófagos são fundamentais tanto na imunidade inata como na imunidade adaptativa. Ao contrário dos fagócitos polimorfonucleares, os macrófagos podem permanecer nos tecidos extravasculares por longos períodos, onde desempenham diversas funções (Figura 2) (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018).

A ingestão de microrganismos por fagocitose é, sem dúvida, uma das principais funções dos macrófagos (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017). A primeira etapa desse processo é o reconhecimento do microrganismo. O microrganismo pode ser reconhecido por PRRs e outros receptores ligados à membrana celular do macrófago. Ao interagir com esses receptores, o microrganismo ativa o processo de internalização. Inicialmente, o macrófago produz extensões fluidas do citoplasma (chamadas pseudópodes) que cobrem o microrganismo e, em seguida, se fecham em torno dele para formar um fagossomo, o qual amadurece para formar um fagolisossomo. Ao final dessa transformação, o fagossomo maduro possui um

microambiente capaz de destruir o microrganismo ingerido (GORDON, 2016; HALLETT, 2020; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2017).

Figura 2 – Principais respostas funcionais dos macrófagos.



Fonte: Produção do próprio autor.

Os macrófagos são fagócitos mononucleares derivados de monócitos circulantes que migram para os tecidos, onde se transformam em macrófagos. As principais respostas funcionais dos macrófagos incluem a fagocitose, a apresentação dos antígenos e a imunomodulação.

O óxido nítrico é um dos principais mediadores citotóxicos associados à fagocitose. Ele é produzido pelas três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), chamadas óxido nítrico sintase endotelial, óxido nítrico sintase neuronal e iNOS (TENOPOULOU; DOULIAS, 2020). Entre elas, a iNOS possui um papel proeminente na produção de óxido nítrico durante a inflamação, sendo expressa principalmente em macrófagos ativados (BOGDAN, 2015; MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; MONCADA, 1999). Uma vez expressa, parte da iNOS é incorporada a vesículas que se fundem ao fagossomo, que está em processo de amadurecimento, promovendo o aumento de óxido nítrico no interior da organela, enquanto a outra parte permanece no citoplasma (VODOVOTZ *et al.*, 1995). Além disso, como o óxido nítrico atravessa as livremente as membranas plasmáticas, parte do óxido nítrico produzido no

citoplasma da célula penetra no fagolisossomo, aumentando ainda mais a quantidade de óxido nítrico no interior da organela (MÖLLER *et al.*, 2005).

Durante a resposta inflamatória, a quantidade de óxido nítrico gerada pela atividade da iNOS supera o óxido nítrico produzido pelas outras isoformas de NOS (XIE; NATHAN, 1994). Assim, é de se esperar que a função desse óxido nítrico derivado da iNOS seja diferente. Sua principal função é como agente citotóxico. Quando associado ao superóxido, óxido nítrico pode ainda formar peroxinitrito (CHANNON; GUZIK, 2002; GUZIK *et al.*, 2002), o qual medeia os efeitos citotóxicos do óxido nítrico, como dano ao ácido desoxirribonucleico, oxidação da lipoproteína de baixa densidade, formação de isoprostanos, nitração de proteínas tirosinas, inibição da aconitase e bloqueio da respiração mitocondrial (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995). O óxido nítrico também tem como alvo muitas proteínas de vias de sinalização centrais para a sobrevivência da célula, como a proteína G, JAK/STAT, NF- κ B e MAP quinases. A nitração de cisteínas nessas proteínas podem levar a sua ativação ou inativação (BOGDAN, 2001; COLEMAN, 2001; MOILANEN; VAPAATALO, 1995).

Além de fagocitar microrganismos, os macrófagos reconhecem, ingerem e destroem células autólogas apoptóticas (GORDON; PLUDDMANN, 2018; KOURTZELIS; HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS, 2020; NAGATA, 2018), infectadas (SHIRATSUCHI; NAKANISHI, 2006), necróticas e detritos (*debris*) celulares como parte do processo de limpeza que se segue à infecção, lesão tecidual e muitos processos fisiológicos, como renovação de tecidos e crescimento (POON; HULETT; PARISH, 2010; WESTMAN; GRINSTEIN; MARQUES, 2020).

Em adição à fagocitose, os macrófagos atuam como APCs, desempenhando um papel importante na imunidade adaptativa (HARDING; CANADAY; RAMACHANDRA, 2010; UNANUE, 1984, 2002). No processo de apresentação de antígenos, os antígenos são capturados pelo macrófago, processados em fragmentos menores (peptídios) e, finalmente, apresentados na superfície celular do macrófago ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para serem reconhecidos por TCRs na superfície de linfócitos T (PARHAM, 2005). Além de apresentarem complexos antígeno-MHC a linfócitos T, os macrófagos proporcionam estímulos adicionais necessários para a completa ativação, divisão e diferenciação dos linfócitos T (ZHU; CHEN, 2009).

Os macrófagos também podem produzir citocinas que regulam e coordenam vários processos celulares (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Essas citocinas

atuam principalmente sobre as próprias células que as produzem (ação autócrina) ou sobre células vizinhas (ação parácrina). Em alguns casos, quando o estímulo para a produção de citocina for suficientemente forte, a quantidade de citocina produzida pode ser tão grande que quantidades significativas entram na corrente sanguínea e atuam sobre células distantes (ação endócrina) (ZHANG; AN, 2007).

No contexto da inflamação, algumas citocinas atuam estimulando a resposta inflamatória (chamadas pró-inflamatórias), enquanto outras atuam suprimindo (chamadas anti-inflamatórias) (DINARELLO, 2007). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, as mais importantes são a IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α (frequentemente chamado apenas TNF) (CONTI *et al.*, 2004; FEGHALI; WRIGHT, 1997; MÖLLER; VILLIGER, 2006; ZHANG; AN, 2007). A primeira delas, a IL-1 β , é o membro mais importante da família IL-1, que inclui 11 ligantes e 10 receptores. A IL-1 β possui dois receptores específicos, chamados receptor de interleucina-1 do tipo 1 (IL-1R1 ou CD121a) e receptor de interleucina-1 do tipo 2 (IL-1R2 ou CD121b), e um correceptor, chamado receptor de interleucina-1 do tipo 3 (IL-1R3) (DINARELLO, 2018; YAZDI; GHORESCHI, 2016). Ambos IL-1R1 e IL-1R3 possuem um domínio citoplasmático do tipo receptor de *Toll*/interleucina-1 (TIR) (GAY; KEITH, 1991; HEGUY *et al.*, 1992). Ao se ligar ao IL-1R1, a IL-1 β induz uma mudança conformacional no receptor que permite a ligação do IL-1R3, formando um complexo trimérico que ativa uma cascata de sinalização intracelular que, por sua vez, induz a resposta funcional da célula (DINARELLO, 2018). Em contraste, o IL-1R2 é um receptor do tipo *decoy* (chamariz) e falha ao ativar a cascata de sinalização intracelular, pois não possui um domínio citoplasmático (COLOTTA *et al.*, 1993; MANTOVANI *et al.*, 2001; RE *et al.*, 1996). A IL-1 β atua sobre quase todos os tipos celulares e seus efeitos incluem a ativação de células endoteliais, a diferenciação de linfócitos T produtoras de IL-17, a elevação da temperatura corporal (pirexia) e a síntese de proteínas de fase aguda no fígado (DINARELLO, 1996, 1997, 2018; YAZDI; GHORESCHI, 2016).

Outra citocina pró-inflamatória também importante, a IL-6, pertence à família IL-6, que consiste em 10 ligantes e 9 receptores (KANG *et al.*, 2020). Os receptores dessa família compartilham a mesma subunidade de sinalização intracelular, uma proteína transmembrana chamada glicoproteína 130 (gp130 ou CD130) (HIBI *et al.*, 1990; KISHIMOTO *et al.*, 1992; TAGA, 1992). Na via de sinalização da IL-6, a citocina primeiro se liga ao seu receptor específico, o receptor de interleucina-6 (IL-6R ou CD126), e o complexo formado se associa com a gp130, que se dimeriza para iniciar

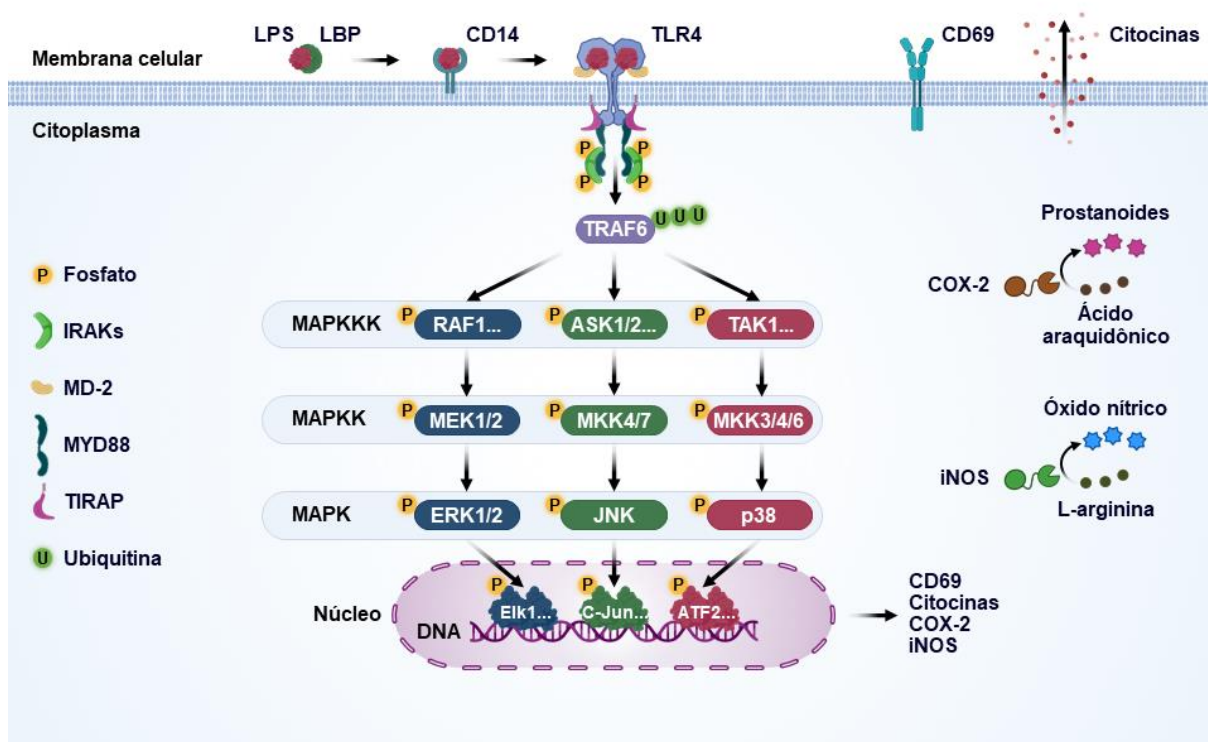
a cascata de sinalização intracelular (ROSE-JOHN, 2018). A gp130 é ubiquamente expressa, enquanto o IL-6R é expresso em hepatócitos e leucócitos. Dessa forma, apenas as células que expressam o IL-6R são sensíveis a IL-6 (HUNTER; JONES, 2015; KANG *et al.*, 2020). Seus principais efeitos incluem a diferenciação de linfócitos T produtoras de IL-17, a proliferação de linfócitos B produtores de anticorpos e a síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos (HUNTER; JONES, 2015; KANG *et al.*, 2020; KISHIMOTO, 2010; ROSE-JOHN, 2018; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

O TNF- α é o principal membro da superfamília TNF, uma das maiores famílias de citocinas, com 18 ligantes e 29 receptores. Os ligantes dessa superfamília são caracterizados por um domínio de homologia ao fator de necrose tumoral (THD), que se liga aos domínios ricos em cisteína dos receptores de TNF (BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002; SO; ISHII, 2019). O TNF- α é produzido principalmente como uma proteína transmembrana (pró-TNF- α), que pode ser clivada por uma metaloproteinase associada à membrana celular para gerar a forma solúvel da citocina (TNF- α) (BLACK *et al.*, 1997; LUM *et al.*, 1999). Ambas as formas do TNF- α são ativas em suas configurações homotriméricas e se ligam a dois receptores distintos, o receptor de fator de necrose tumoral 1 e 2, os quais também formam homotrímeros ao se associarem às THDs dos ligantes, resultando em um complexo hexâmero na superfície celular que inicia a transdução do sinal (BRADLEY, 2008; SO; ISHII, 2019). Dessa forma, a via de sinalização do TNF- α controla uma variedade de processos celulares, incluindo a ativação de células endoteliais e leucócitos (BRADLEY, 2008; IDRIS; NAISMITH, 2000; TRACEY; CERAMI, 1994).

Dentre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 é uma das mais importantes (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989). Ela pertence à família de citocinas anti-inflamatórias IL-10, composta por 9 ligantes e 6 receptores (OUYANG; O'GARRA, 2019; WEI *et al.*, 2019). O ligante IL-10 consiste em um homodímero (TAN *et al.*, 1993; WINDSOR *et al.*, 1993) que se liga a um complexo receptor heterodimérico formado por um receptor de ligação ao ligante, o receptor de interleucina-10 do tipo 1, e um receptor acessório de sinalização intracelular, o receptor de interleucina-10 do tipo 2 (MOORE *et al.*, 2001). Como ambos os receptores de IL-10 são amplamente expressos entre os leucócitos, a ação anti-inflamatória da IL-10 se estende a vários aspectos da resposta imunológica (BURMEISTER; MARRIOTT, 2018; MOORE *et al.*, 2001; MOSSER; ZHANG, 2008; WEI *et al.*, 2019; WOLK *et al.*, 2002).

Para que os macrófagos desempenhem todas essas funções, eles precisam ser ativados por DAMPs e PAMPs (DALBY, 2018; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Esse processo é mediado por PRRs, como o TLR4, que reconhece o LPS, o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas (BEUTLER, 2002; BEUTLER; DU; POLTORAK, 2001). O LPS bacteriano consiste em um domínio hidrofóbico (chamado lipídeo A ou endotoxina), um oligossacarídeo central (chamado *core*) e um polissacarídeo distal (chamado antígeno O) (RAETZ; WHITFIELD, 2002). O reconhecimento de quantidades mínimas de LPS pelo TLR4 é capaz de iniciar uma cascata de sinalização intracelular na qual a informação é transmitida do TLR4 para o núcleo da célula por meio de uma série de interações proteína-proteína e fosforilação de proteínas que estimula a expressão de genes relacionados à função efetora dos macrófagos (Figura 3) (KUZMICH *et al.*, 2017).

Figura 3 – Via de sinalização LPS/TLR4/MAP quinases.



Fonte: Produção do próprio autor.

Inicialmente, o LPS é reconhecido pela LBP e, então é transferido para o TLR4 por meio de uma série de interações proteína-proteína. Em seguida, o TLR4 se associa para formar um heterodímero que ativa vias de sinalização intracelular, como as MAP quinases, que, por sua vez, ativam fatores de transcrição que induzem a expressão de genes relacionados à inflamação.

O reconhecimento do LPS pelo TLR4 ocorre de forma indireta, sendo necessária a participação de proteínas acessórias para que o TLR4 se torne responsivo ao LPS. Inicialmente, o LPS é reconhecido pela proteína de ligação ao lipopolissacarídeo (LBP), uma glicoproteína presente no sangue ou fluido extracelular com a qual o LPS forma um complexo solúvel de alta afinidade (GIOANNINI *et al.*, 2005; HAILMAN *et al.*, 1994; IOVINE *et al.*, 2002; YU; WRIGHT, 1996). Em seguida, a LBP interage com o homodímero CD14, ancorado na membrana celular ou solúvel, e o LPS é, então, transferido da LBP para o CD14 (KELLEY *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2005; KITCHENS, 2000; PŁÓCIENNIKOWSKA *et al.*, 2015; TOBIAS *et al.*, 1995). Por fim, o CD14 interage com os domínios extracelulares de repetição rica em leucina (LRR) 13 e 15 do TLR4 e o LPS é novamente transferido, desta vez, do CD14 para a proteína de diferenciação mieloide 2 (MD-2), que está ligada ao TLR4. Dessa forma, a base estrutural da especificidade do TLR4 para o LPS reside nos domínios extracelulares do receptor LRR13 e LRR15, os quais são essenciais para a transferência do LPS do CD14 para a MD-2, que, então, se liga ao domínio lipídeo A do LPS (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021; DA SILVA CORREIA *et al.*, 2001; GIOANNINI *et al.*, 2005; KIM; KIM, 2017; RYU *et al.*, 2017).

A próxima etapa, a transdução do sinal, é iniciada pela dimerização de dois complexos LPS/MD-2/TLR4, colocando os domínios citoplasmáticos de sinalização intracelular de cada TLR4 em justaposição (MENG *et al.*, 2011; PANTER; JERALA, 2011; PARK *et al.*, 2009). Esses domínios são do tipo TIR e cada um deles forma uma interação homofílica com os domínios TIR de duas proteínas adaptadoras *downstream*, a proteína adaptadora contendo o domínio receptor de *Toll*/interleucina-1 (TIRAP) (BONHAM *et al.*, 2014; HORNG *et al.*, 2002) e o adaptador de transdução de sinal imunológico inato MYD88 (MYD88) (FITZGERALD *et al.*, 2001).

O TLR4 interage primeiro com a TIRAP, que atua como um regulador do sinal do receptor. Essa proteína possui um domínio de ligação de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, responsável pelo recrutamento e ancoramento da proteína na face citosólica da membrana celular, onde atua facilitando o recrutamento e ligação da proteína adaptadora MYD88 (KAGAN; MEDZHITOV, 2006). A proteína adaptadora MYD88 possui um domínio de morte que recruta a quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) 4 para formar o complexo MYD88/IRAK4, o qual recruta a IRAK1/2, formando o um oligômero chamado *myddosome*. Essa conformação permite a autofosforilação da IRAK4 e a fosforilação da IRAK1/2 pela IRAK4 (FERRAO *et al.*,

2014; LIN; LO; WU, 2010; MOTSHWENE *et al.*, 2009). Além disso, a formação do *myddosome* recruta o fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral (TRAF) 6 (GUVEN-MAIOROV *et al.*, 2015; WU, 2013). A proteína TRAF6 é uma ligase de ubiquitina que, após sofrer autoubiquitinação, move-se em direção ao citoplasma, onde ativa vias de sinalização intracelular, como as MAP quinases (KUZMICH *et al.*, 2017; LU; YEH; OHASHI, 2008; WALSH; LEE; CHOI, 2015).

As MAP quinases referem-se a um grupo de proteínas estruturalmente relacionadas que desempenham um papel central na imunidade e em vários outros aspectos do organismo. Essas proteínas são quinases que fosforilam resíduos de serina-treonina e, então, ativam a proteína a jusante. Assim, as MAP quinases funcionam como comutadores *downstream* baseados em fosforilação que transmitem o sinal do TLR4 (KAWAI; AKIRA, 2007; KUZMICH *et al.*, 2017; LU; YEH; OHASHI, 2008). A família MAP quinase inclui três proteínas quinases em várias isoformas: a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) 1-8, a quinase N-terminal c-Jun (JNK) 1-3 e a p38- α , - β , - γ e - δ (DHILLON *et al.*, 2007; KIM; CHOI, 2010; SCHAEFFER; WEBER, 1999). Cada eixo de sinalização das MAP quinases inclui pelo menos três componentes: uma MAP quinase quinase quinase, uma MAP quinase quinase e uma MAP quinase. Na cascata de sinalização intracelular, a MAP quinase quinase quinase fosforila e ativa a MAP quinase quinase, que fosforila e ativa a MAP quinase, que fosforila e ativa fatores de transcrição, que induzem a expressão de genes cujos produtos são importantes para a resposta efetora dos macrófagos (KIM; CHOI, 2010, 2015; LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020).

Dessa forma, os efeitos imunossupressores apresentados pela PAT, os quais abrangem vários componentes do sistema imunológico, especialmente os macrófagos (BOURDIOL; ESCOULA; SALVAYRE, 1990; ESCOULA *et al.*, 1988a; ESCOULA *et al.*, 1988b; OH *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2015a; OH *et al.*, 2015b; OZSOY *et al.*, 2008; TSAI *et al.*, 2016), justificam a investigação da sinalização envolvida durante o processo inflamatório agudo. Além disso, o estudo do potencial anti-inflamatório da PAT é justificado pela demanda por novas ferramentas farmacológicas para o controle da inflamação, uma vez que a inflamação é um fator determinante para a progressão de muitas doenças (ARULSELVAN *et al.*, 2016). Adicionalmente, os fármacos disponíveis para o tratamento da inflamação apresentam inúmeros efeitos adversos quando utilizados por longos períodos (BACCHI *et al.*, 2012; ORAY *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS**3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o efeito da PAT em macrófagos peritoneais murinos ativados com LPS.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar o efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos;
 - Determinar o efeito da PAT na produção de óxido nítrico;
 - Avaliar o efeito da PAT na expressão das proteínas CD69, iNOS e TLR4;
 - Quantificar o efeito da PAT na expressão do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) que codifica as proteínas CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS;
 - Determinar o efeito da PAT na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α ;
 - Avaliar o efeito da PAT na fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38.
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da realização dos experimentos

Os protocolos experimentais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, no LIMFA e no ONCOFAR do CBiotec da UFPB (João Pessoa, PB, BR) e no Laboratório de Biologia Molecular e no LCC do ICB da FURG (Rio Grande, RS, BR).

4.2 Reagentes

A PAT (massa molar: 154,12 g/mol; fórmula molecular: $C_7H_6O_4$; número de catálogo: P1639), a estreptomicina, a *N*-(1-naftil) etilenodiamina, a penicilina, a sulfanilamida, o ácido orto-fosfórico, azul de tripano, o bicarbonato de sódio, o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), o cloreto de sódio, o dimetilsulfóxido (DMSO), o fosfato de sódio dibásico, o fosfato de sódio monobásico, o meio RPMI-1640 (número de catálogo: R8755), o meio tioglicolato (número de catálogo: T9032-500G) e o nitrito de sódio foram comprados da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, US). A agarose, o kit de transcrição reversa (RT) de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) de alta capacidade (número de catálogo: 4368814), o LPS de *Escherichia coli* (número de catálogo: 00-4976-93), o reagente TRIzol® (número de catálogo: 15596026), os anticorpos anti-CD16/CD32 (número de catálogo: 14-0161-86), anti-CD69 (número de catálogo: 11-0691-81) e anti-TLR4 (número de catálogo: 12-9041-80), os kits de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) não revestido para IL-1 β (número de catálogo: 88-7013-22), IL-6 (número de catálogo: 88-7064-22), IL-10 (número de catálogo: 88-7105-22) e TNF- α (número de catálogo: 88-7324-22) e os oligonucleotídeos foram comprados da Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, US). O anticorpo anti-iNOS (número de catálogo: sc-7271) foi comprado da Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, TX, US). O brometo de etídio foi comprado da Ludwig Biotecnologia Ltda (Alvorada, RS, BR). O kit master mix de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) GoTaq® (número de catálogo: A6001) foi comprado da Promega Corporation (Madison, WI, US). O soro fetal bovino foi comprado da Cultilab® (Campinas, SP, BR). Os anticorpos anti-p-ERK 1/2 (número de catálogo: 612566), anti-p-JNK 1/2 (número de catálogo: 562480) e anti-p-p38

(número de catálogo: 560241), o tampão de fixação BD Cytifix® (número de catálogo: 554655) e o tampão de permeabilização BD Phosflow® III (número de catálogo: 558050) foram comprados da BD Biosciences (San Jose, CA, US).

4.3 Animais

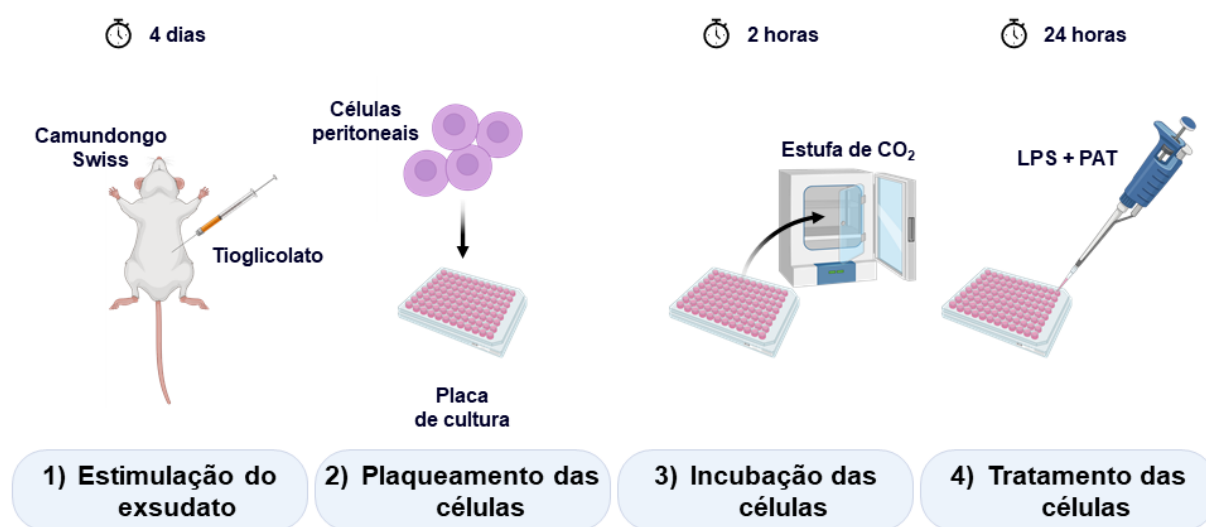
Os camundongos albinos suíços fêmeas (6-8 semanas) foram fornecidos pelo Biotério Prof. Thomas George do IPeFarM da UFPB (João Pessoa, PB, BR). Os animais foram mantidos em condições laboratoriais padrão em um ciclo claro/escuro de 12 h constante com temperatura controlada (21 ± 2 °C). O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum*. Os protocolos experimentais obedeceram os critérios estabelecidos pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008). A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical, pois o uso de anestésicos gerais injetáveis ou inalatórios comprometeria os resultados experimentais, conforme os procedimentos de eutanásia das Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (BRASIL, 2013). Além disso, todos os protocolos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituição (protocolo: 105/2016, data de aprovação do estudo animal: 16/11/2017; APÊNDICE A).

4.4 Isolamento de macrófagos peritoneais murinos

O exsudato peritoneal nos camundongos albinos suíços foi eliciado um com uma injeção intraperitoneal de 2 ml de meio tioglicolato a 4% (Figura 4). Quatro dias após, os animais foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 5 ml de tampão fosfato-salino (PBS; cloreto de sódio: 0,8760%, fosfato de sódio dibásico: 0,1550% e fosfato de sódio monobásico: 0,0288%) gelado, seguido por uma massagem de 30 s e coleta do fluido. A suspensão celular obtida da lavagem peritoneal foi centrifugada por 5 min a 1.500 rpm (4 °C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 2 ml de meio RPMI-1640 completo (bicarbonato de sódio: 0,002 g/ml, estreptomicina: 100 µg/ml, penicilina: 100 unidades/ml e soro fetal bovino: 10%). As células viáveis foram contadas em uma câmara de Neubauer usando a solução de azul de tripano (azul de tripano: 0,4% e cloreto de sódio: 0,9%) e foram utilizadas as células com viabilidade celular maior ou igual a 90%. Em seguida, os macrófagos

foram separados por aderência em plástico. Para isso, as células peritoneais viáveis foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo plano TPP® (2×10^5 células/poço em um volume final de 200 μ l), TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, SH, CH), e incubadas por 2 h com o meio RPMI-1640 completo em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Então, as células não aderentes foram descartadas. As células restantes foram estimuladas com LPS (1 μ g/ml) e tratadas com diferentes concentrações de PAT (62,5-4.000 ng/ml), de acordo com o trabalho de Bourdiol *et al.* (1990), que usou concentrações de 10 a 4.000 ng/ml. A solução estoque de PAT (5 mg/ml) foi preparada em DMSO e a concentração final de DMSO não excedeu 0,08%. Na condição controle, foi usado apenas meio RPMI-1640. Além disso, um segundo grupo controle foi adicionado usado apenas DMSO e meio RPMI-1640. Após 24 h de incubação, os macrófagos foram usados para o ensaio de viabilidade celular e o sobrenadante da cultura foi coletado para a determinação da produção de óxido nítrico, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α .

Figura 4 – Resumo gráfico do protocolo de isolamento de macrófagos peritoneais murinos.



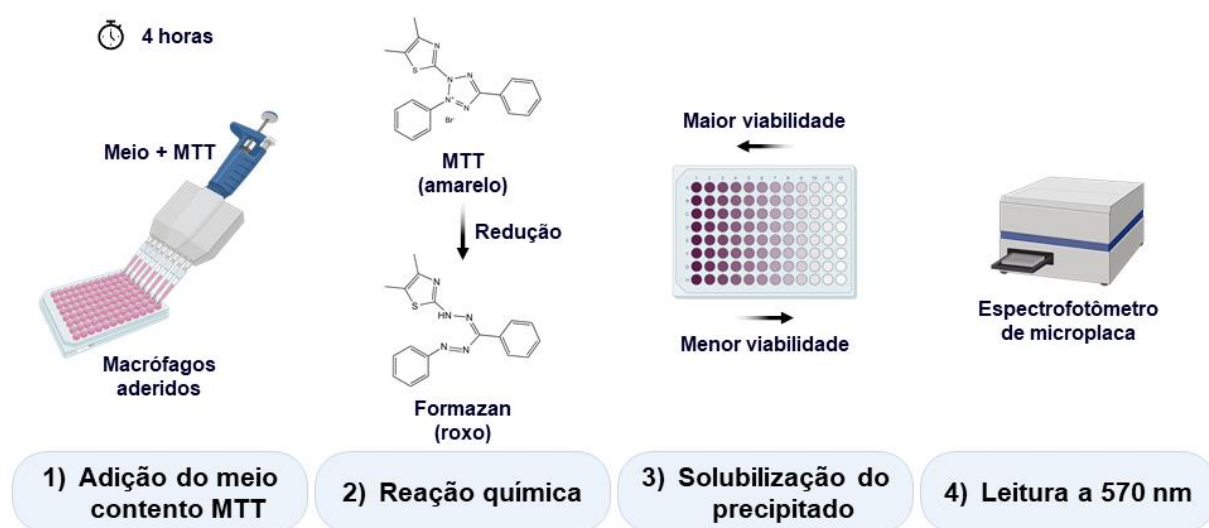
Fonte: Produção do próprio autor.

Resumidamente, foi eliciado um exsudato peritoneal nos camundongos com uma injeção intraperitoneal de meio tioglicolato. Após 4 dias, as células peritoneais foram coletadas e os macrófagos foram separados por aderência em plástico. Para isso, as células peritoneais foram plaqueadas e incubadas por 2 h com o meio RPMI-1640 completo em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Por fim, as células foram estimuladas com LPS (1 μ g/ml) e tratadas com diferentes concentrações de PAT (62,5-4.000 ng/ml).

4.5 Efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos

A viabilidade celular foi estimada usando o reagente MTT (MOSMANN, 1983). Para isso, como mostrado na Figura 5, foram adicionados 100 µl de meio RPMI-1640 completo contendo 10 µl da solução de MTT (5 mg/ml de MTT em PBS). Após 4 h de incubação, o meio contendo MTT foi descartado e o precipitado formazan foi solubilizado em 100 µl de DMSO. A densidade óptica foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro de microplaca BioTek® ELx800®, Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, US).

Figura 5 – Resumo gráfico do protocolo de ensaio de viabilidade celular usando o reagente MTT.



Fonte: Produção do próprio autor.

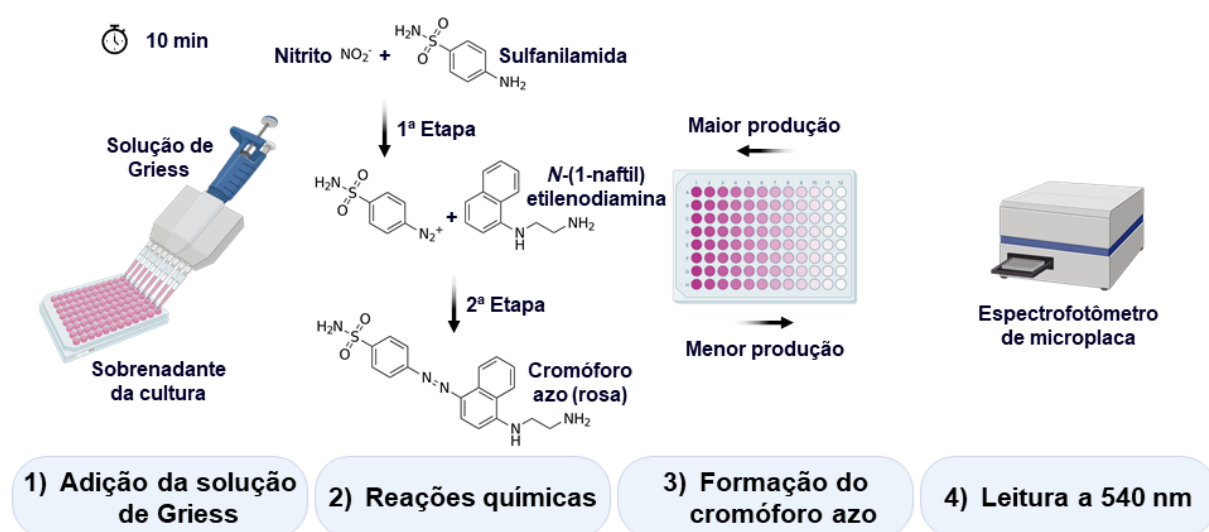
Resumidamente, foram adicionados 100 µl de meio RPMI-1640 completo contendo 10 µl da solução de MTT (5 mg/ml de MTT em PBS) à monocamada de células. O tetrazólio MTT (amarelo) é reduzido em formazan (roxo) pelas desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas. Após 4 h de incubação, o meio contendo MTT foi descartado e o precipitado formazan foi solubilizado em 100 µl de DMSO. A densidade óptica foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro de microplaca.

4.6 Efeito da PAT na produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi estimada indiretamente pela quantificação do nitrito, o produto mais estável do óxido nítrico, usando a solução de Griess (GRIESS, 1879). Resumidamente, foram misturados 50 µl do sobrenadante da cultura com 50

μl da solução de Griess (ácido orto-fosfórico: 5%, *N*-[1-naftil] etilenodiamina: 0,1% e sulfanilamida: 1%) à temperatura ambiente por 10 min (Figura 6). A densidade óptica foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro de microplaca BioTek® ELx800®, Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, US). Para preparação da curva padrão, foi empregado nitrito de sódio.

Figura 6 – Resumo gráfico do protocolo de determinação da produção de óxido nítrico usando a solução de Griess.



Fonte: Produção do próprio autor.

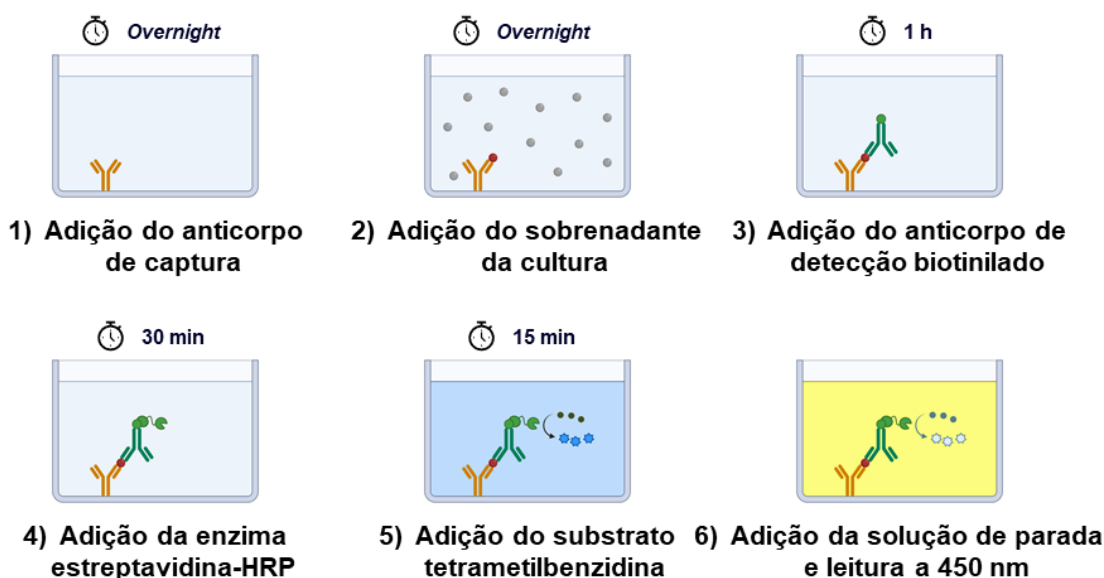
Resumidamente, foram misturados 50 μl do sobrenadante da cultura com 50 μl da solução de Griess à temperatura ambiente por 10 min. A reação de Griess consiste na diazotização da sulfanilamida pelo nitrito acidificado seguida pela reação de acoplamento com a *N*-(1-naftil) etilenodiamina, fornecendo um cromóforo azo (rosa). A densidade óptica foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro de microplaca.

4.7 Efeito da PAT na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α

A produção de citocinas foi determinada por ELISA sanduiche, conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, as placas de 96 poços de fundo plano para ELISA Corning® Costar® 9018, Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, US), foram sensibilizadas com 100 μl do anticorpo de captura e incubadas *overnight* a 4 °C (Figura 7). Então, o sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas 5 vezes com 300 μl de tampão de lavagem (Tween® 20: 0,05% em PBS). Os sítios de interações inespecíficas foram bloqueados com 200 μl do diluente ELISA/ELISPOT

(1X) e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h. Após 5 lavagens, foram adicionados 100 µl do sobrenadante da cultura e as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após 5 lavagens, foram adicionados 100 µl do anticorpo de detecção biotilado e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h. Após 5 lavagens, foram adicionados 100 µl da enzima estreptavidina-HRP e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min. Após 5 lavagens, foram adicionados 100 µl do substrato tetrametilbenzidina e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min. Então, foram adicionados 100 µl da solução de parada (ácido orto-fosfórico: 1 M). A densidade óptica foi determinada a 450 nm em espectrofotômetro de microplaca BioTek® ELx800®, Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, US). Foram usadas citocinas recombinantes para a curva padrão.

Figura 7 – Resumo gráfico do protocolo de determinação da produção de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α por ELISA.



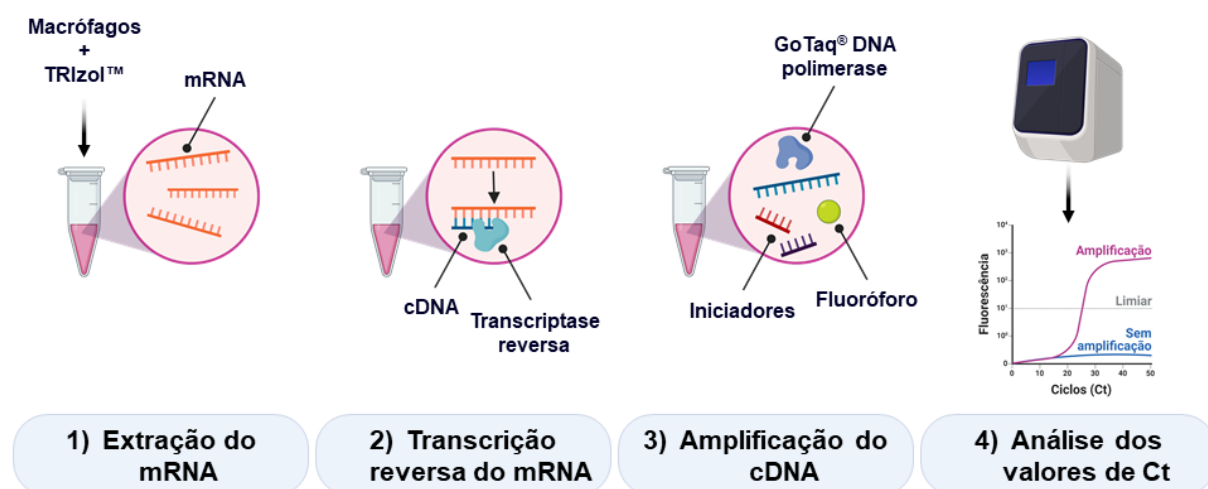
Fonte: Produção do próprio autor.

Resumidamente, as placas foram sensibilizadas com 100 µl do anticorpo de captura, que se liga especificamente a um determinado epítipo do antígeno. Após *overnight*, foram adicionados 100 µl do sobrenadante da cultura para imobilização dos antígenos na superfície dos poços da placa para ELISA. Após *overnight*, foram adicionados 100 µl do anticorpo de detecção biotilado, que se liga especificamente a outro determinado epítipo do antígeno. Após 1 h, foram adicionados 100 µl da enzima estreptavidina-HRP. Após 30 min, foram adicionados 100 µl do substrato tetrametilbenzidina e as placas foram incubadas por 15 min. A enzima estreptavidina-HRP consiste em uma proteína chamada estreptavidina, que se liga especificamente à biotina presente no anticorpo de detecção, conjugada com enzimas HRP, responsáveis pela catálise do substrato tetrametilbenzidina e, conseqüentemente, geração do sinal. Por fim, foram adicionados 100 µl da solução de parada (ácido orto-fosfórico: 1 M) e a densidade óptica foi determinada a 450 nm em espectrofotômetro de microplaca.

4.8 Efeito da PAT na expressão do mRNA que codifica as proteínas CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS

Os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados em placas de 6 poços de fundo plano TPP® (2×10⁶ células/poço em um volume final de 2 ml), TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, SH, CH), para aderência. Então, as células foram estimuladas com LPS (1 µg/ml) e tratadas com PAT (250 ng/ml). Após 24 h de incubação, o RNA total foi extraído da monocamada de células usando o reagente TRIzol®, conforme as instruções do fabricante (Figura 8). A densidade óptica foi determinada a 260 nm (quantidade) e 260/280 nm (qualidade) em espectrofotômetro BioDrop µLite, SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, BW, DE). A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel (agarose: 1,5% brometo de etídio: 0,5 µg/mL). O cDNA foi sintetizado pela RT de 1 µg do RNA usando o kit de RT de cDNA de alta capacidade, conforme as instruções do fabricante, e um termociclador TC-3000, Mason Technology (Dublin, DB, IE). A qPCR foi realizada conforme o protocolo do kit master mix de qPCR GoTaq® em termociclador 7300 Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, US). Os iniciadores específicos para cada gene (Tabela 1) foram projetados baseados em sequências disponíveis no banco de dados GenBank® usando a ferramenta Primer-BLAST® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as características dos iniciadores foram avaliadas usando a ferramenta OligoAnalyzer® (<https://www.idtdna.com>). A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi avaliada por reações de diluições seriadas. Os genes *Actb* e *Gapdh*, que codificam a β -actina e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), respectivamente, foram usados como genes de referência após apresentarem estabilidade quando testados com a ferramenta geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). O fator de normalização foi calculado como a média geométrica dos valores de expressão do mRNA dos genes de referência testados usando a ferramenta geNorm. Por fim, os níveis de expressão relativa do mRNA dos genes alvos foram calculados como a razão do valor da expressão do mRNA de cada gene alvo pelo fator de normalização.

Figura 8 – Resumo gráfico do protocolo de quantificação da expressão do mRNA do CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS por RT-qPCR.



Fonte: Produção do próprio autor.

Resumidamente, o RNA total foi extraído da monocamada de células usando o reagente TRizol®. Então, o cDNA foi sintetizado pela RT de 1 μ g do RNA usando o kit de RT de cDNA de alta capacidade. Por fim, a qPCR foi realizada conforme o protocolo do kit master mix de qPCR GoTaq® usando um termociclador e os valores de ciclos (Ct) foram analisados.

Tabela 1 – Iniciadores usados na RT-qPCR.

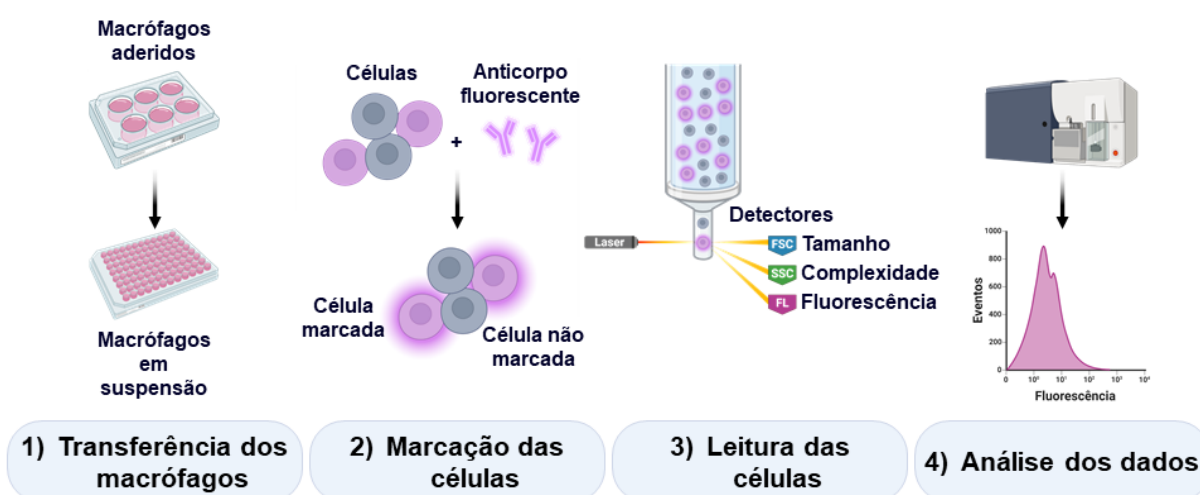
Gene	Sequência do iniciador (5'-3')	Tamanho do produto	Eficiência de amplificação	GenBank
<i>Cd69</i>	F: AGCTACATCTCTCCGTGGACC R: GTATACTGGTGCCATGGTCCTTC	148 pb	97.7%	NM_001033122.4
<i>Il1b</i>	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: TGATGTGCTGCTGCGAGATT	138 pb	90.9%	NM_008361.4
<i>Nos2</i>	F: TCTAGTGAAGCAAAGCCCAAC R: CACATACTGTGGACGGGTCG	142 pb	106.2%	NM_001313921.1
<i>Ptgs2</i>	F: AGCCAGGCAGCAAATCCTT R: CAGTCCGGGTACAGTCACAC	100 pb	111.3%	NM_011198.4
<i>Actb</i>	F: CACTGTCGAGTCGCGTCC R: TCATCCATGGCGAACTGGTG	89 pb	100.6%	NM_007393.5
<i>Gapdh</i>	F: GGAGAGTGTTTCCTCGTCCC R: ATGAAGGGGTCGTTGATGGC	136 pb	105.8%	NM_001289726.1

Notas: *Cd69*: CD69; *Il1b*: IL-1 β ; *Nos2*: iNOS; *Ptgs2*: COX-2; *Actb*: β -actina; *Gapdh*: GAPDH.

4.9 Efeito da PAT na expressão das proteínas CD69 e TLR4

Os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados em placas de 6 poços de fundo plano hidrofóbicas CELLSTAR® ($1,5 \times 10^6$ células/poço em um volume final de 2 ml), Greiner AG (Kremsmünster, OÖ, AT), para aderência. Então, as células foram estimuladas com LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) e tratadas com PAT (250 ng/ml). Após 24 h de incubação, como mostrado na Figura 9, as células foram coletadas e transferidas para placas de 96 poços de fundo U CELLSTAR®, Greiner AG (Kremsmünster, OÖ, AT). Então, as células foram bloqueadas para prevenir interações mediadas por Fc inespecíficas usando o anticorpo anti-CD16/CD32 e marcadas separadamente com os anticorpos anti-CD69 (FITC) e anti-TLR4 (PE), conforme as instruções do fabricante. Por fim, as células foram ressuspensas em tampão PBS e avaliadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto® II, Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, US). Foi adquirido um mínimo de 10.000 eventos para cada amostra.

Figura 9 – Resumo gráfico do protocolo de avaliação da expressão de CD69, iNOS e TLR4 e da fosforilação das MAP quinases ERK, JNK2 e p38 por citometria de fluxo.



Fonte: Produção do próprio autor.

Resumidamente, as células foram coletadas e transferidas para placas de 96 poços de fundo U e marcadas separadamente com os anticorpos fluorescentes. Por fim, as células foram avaliadas usando um citômetro de fluxo e a intensidade da fluorescência correspondente a marcação do anticorpo foi determinada.

4.10 Efeito da PAT na expressão da proteína iNOS e na fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38

As mesmas condições de cultura foram realizadas para a avaliação da expressão de iNOS e da fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38, conforme descrito na sessão anterior. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas e transferidas para placas de 96 poços de fundo U CELLSTAR®, Greiner AG (Kremsmünster, OÖ, AT). Então, as células foram fixadas usando o tampão de fixação BD Cytotfix® e permeabilizadas usando o tampão de permeabilização BD Phosflow® III por 30 min cada, conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, as células foram marcadas separadamente com os anticorpos anti-iNOS (PE), anti-p-ERK 1/2 (PE), anti-p-JNK 1/2 (PE) e anti-p-p38 (PE-Cy7), conforme as instruções do fabricante. Por fim, as células foram ressuspensas em tampão PBS e avaliadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto® II, Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, US). Foi adquirido um mínimo de 10.000 eventos para cada amostra.

4.11 Análise de dados de citometria de fluxo

Os dados de citometria de fluxo foram analisados usando o software FlowJo® X versão 10.6.2, FlowJo LLC (Ashland, OR, US). Resumidamente, as células foram visualizadas usando os parâmetros de dispersão frontal e lateral (tamanho e complexidade interna, respectivamente) e uma região foi criada na população de macrófagos. Então, a intensidade da fluorescência correspondente a marcação do anticorpo foi determinada.

4.12 Análise estatística

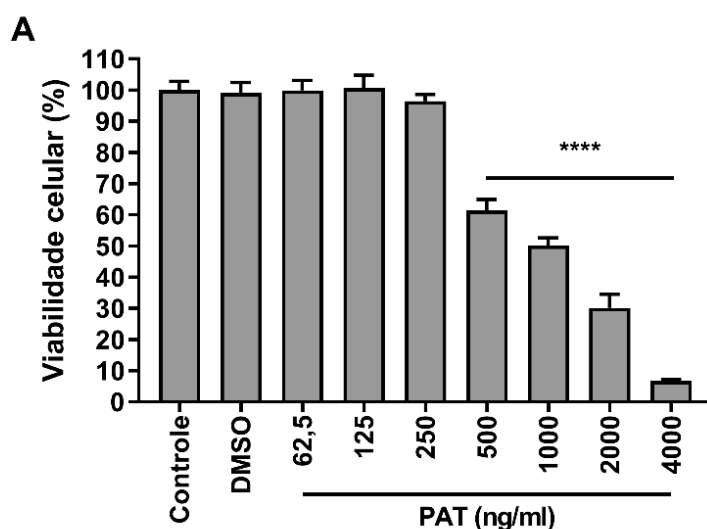
A curva de inibição foi ajustada por análise de regressão não linear assumindo um modelo de curva de concentração-resposta sigmoide e a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) foi estimada. Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 9.1.0, GraphPad Software Inc (San Diego, CA, US), usando análise de variância (ANOVA) *one-way* seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

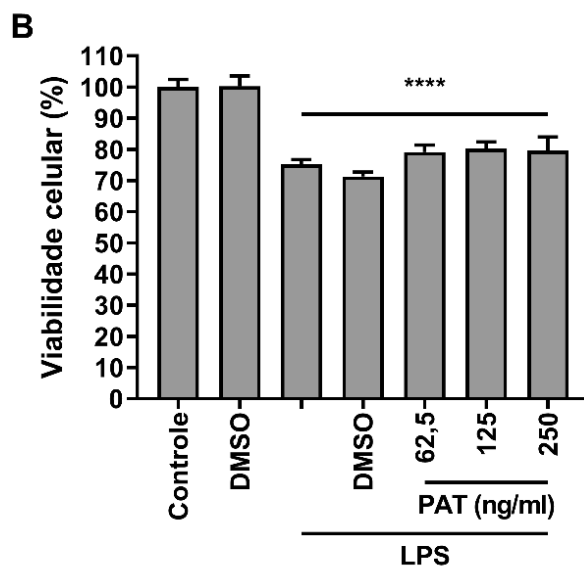
5 RESULTADOS

5.1 Efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos

Foi avaliado o efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. A PAT nas concentrações de 62,5; 125 e 250 ng/ml não afetou a viabilidade celular (Figura 10 A). Por outro lado, concentrações mais altas de PAT (500, 1.000, 2.000 e 4.000 ng/ml) reduziram significativamente a viabilidade celular (38,6; 49,9; 69,9 e 93,3%, respectivamente) com o valor de IC₅₀ de 963,2 ng/ml. Além disso, como mostrado na Figura 10 B, as concentrações não tóxicas de PAT (62,5; 125 e 250 ng/ml) não aumentaram a morte celular induzida pelo LPS, sendo escolhidas para os próximos ensaios.

Figura 10 – Efeito da PAT na viabilidade de macrófagos peritoneais murinos.



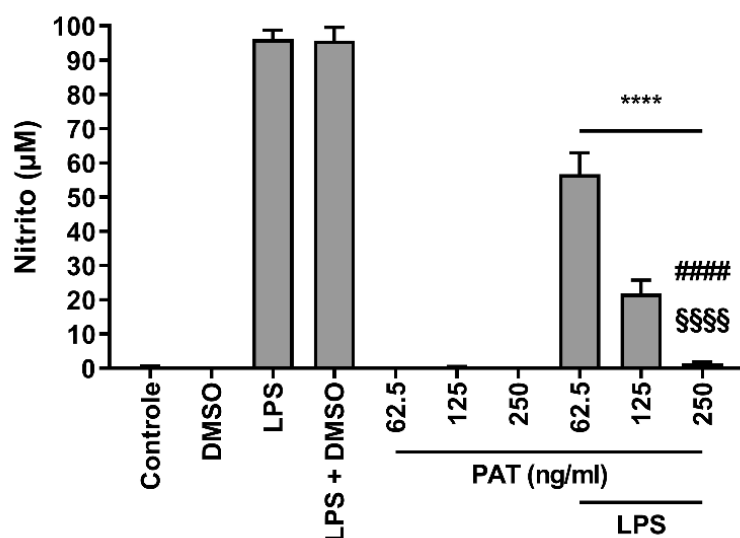


(A) Os macrófagos ($n = 4$ em triplicada) foram tratados com diferentes concentrações de PAT (62,5-4.000 ng/ml). (B) Os macrófagos ($n = 6$ em triplicata) foram tratados com LPS e PAT (62,5, 125 e 250 ng/ml). Após 24 h de incubação, a viabilidade celular foi estimada usando o reagente MTT. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 9.1.0 usando ANOVA *one-way* seguida do teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle.

5.2 Efeito da PAT na produção de óxido nítrico

O LPS representa um dos principais indutores da produção de óxido nítrico em macrófagos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; MONCADA, 1999). De acordo com dados anteriores do nosso grupo (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2017; SALES-NETO *et al.*, 2019), os macrófagos estimulados mostraram um aumento significativo na produção do óxido nítrico (95,9 μ M) em comparação com o grupo controle (Figura 11). Por outro lado, a PAT (62,5; 125 e 250 ng/ml) reduziu significativamente a produção do óxido nítrico induzida pelo LPS (41,1; 77,3 e 98,4%, respectivamente). A concentração de 250 ng/ml de PAT foi escolhida para os próximos ensaios.

Figura 11 – Efeito da PAT na produção de óxido nítrico.

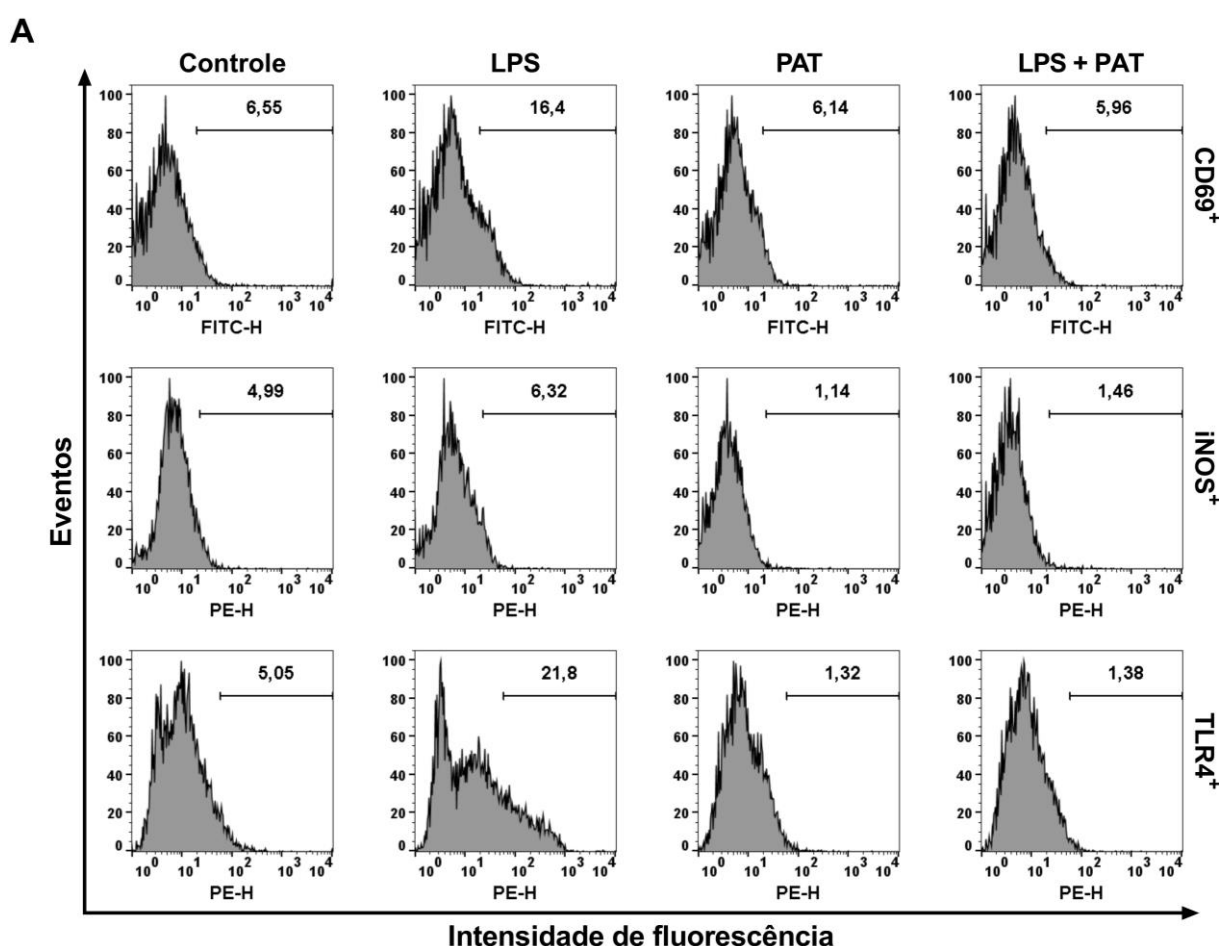


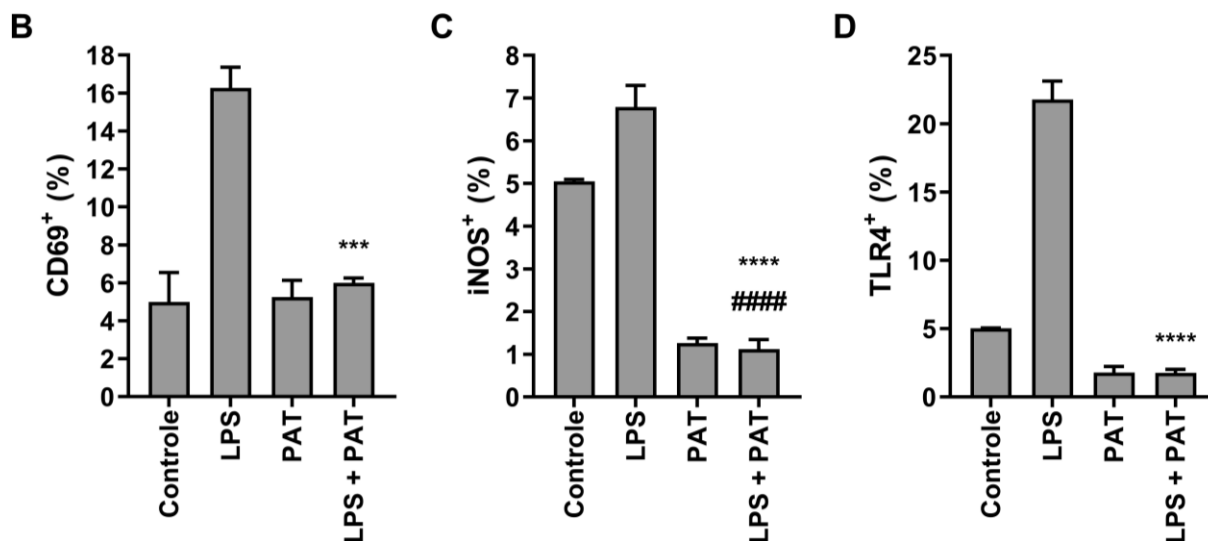
Os macrófagos ($n = 6$ em triplicata) foram tratados com LPS e PAT (62,5, 125 e 250 ng/ml). Após 24 h de incubação, a produção de óxido nítrico foi determinada usando a solução de Griess. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 9.1.0 usando ANOVA *one-way* seguida do teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS; #### $p < 0,0001$ comparado com o grupo PAT (62,5 ng/ml) + LPS; e \$\$\$\$ $p < 0,0001$ comparado com o grupo PAT (125 ng/ml) + LPS.

5.3 Efeito da PAT na expressão das proteínas CD69, iNOS e TLR4

Conforme mostrado na Figura 12 A, B, C e D, o grupo controle apresentou a expressão basal do CD69, iNOS e TLR4, enquanto o grupo LPS apresentou a superexpressão dessas proteínas nos macrófagos ativados. Em oposição, a PAT (250 ng/ml) reduziu significativamente a expressão do CD69 (63,1%), iNOS (83,5%) e TLR4 (91,9%) na presença do LPS.

Figura 12 – Efeito da PAT na expressão das proteínas CD69, iNOS e TLR4.



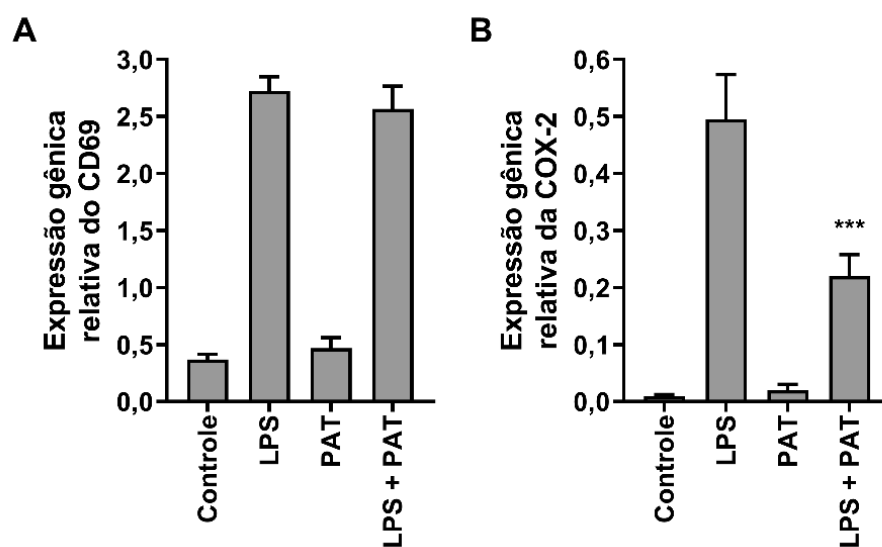


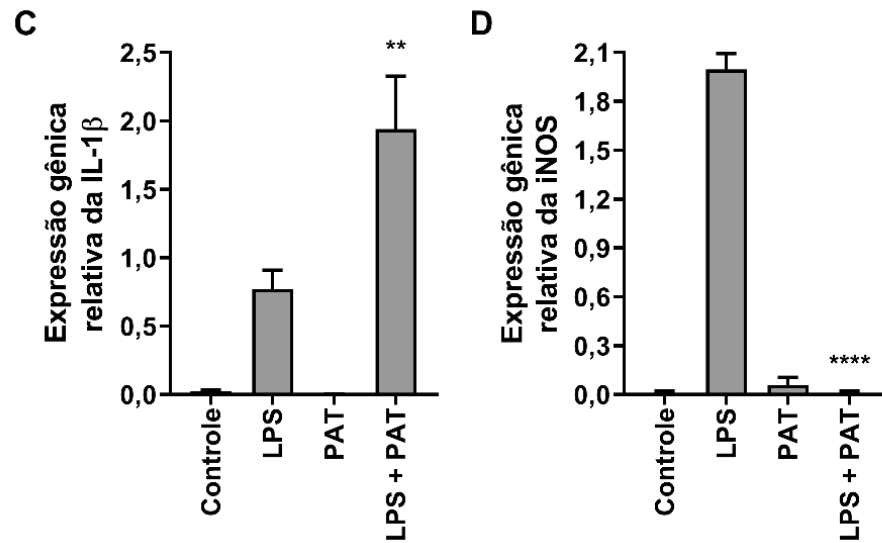
Os macrófagos ($n = 4$) foram tratados com LPS e PAT (250 ng/ml). Após 24 h de incubação, os histogramas de fluorescência representativos (A) e a expressão de CD69⁺ (B), iNOS⁺ (C) e TLR4⁺ (D) foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados da citometria de fluxo foram analisados usando o software FlowJo® X versão 10.6.2. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 9.1.0 usando ANOVA *one-way* seguida do teste de Tukey. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS e ##### $p < 0,0001$ comparado com o grupo controle.

5.4 Efeito da PAT na expressão do mRNA que codifica as proteínas CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS

Como esperado, a estimulação com o LPS induziu um aumento significativo na expressão do mRNA do CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS (Figura 13 A, B, C e D respectivamente). A PAT (250 ng/ml) reduziu significativamente a expressão do mRNA da COX-2 (55,6%) e da iNOS (100,0%) na presença do LPS, sem interferir na expressão do mRNA do CD69. Além disso, a PAT aumentou em 151,3% a expressão do mRNA da IL-1 β em combinação com o LPS.

Figura 13 – Efeito da PAT na expressão do mRNA que codifica as proteínas CD69, COX-2, IL-1 β e iNOS.



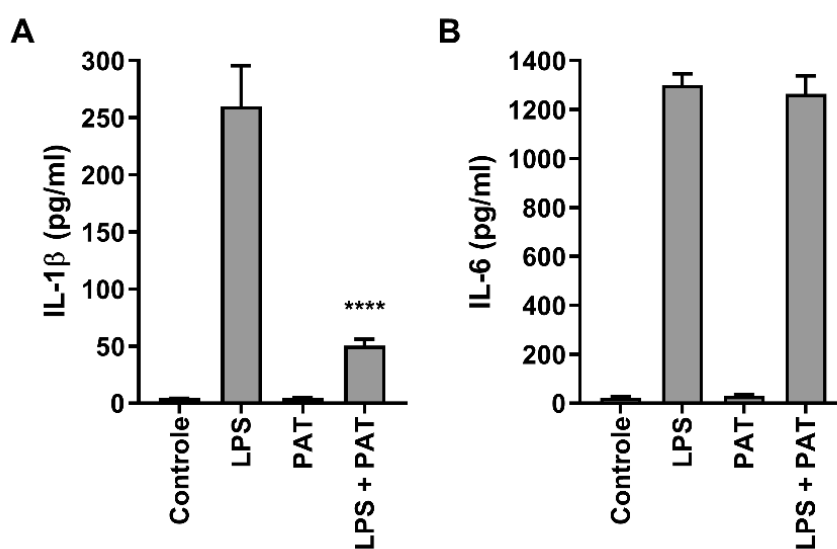


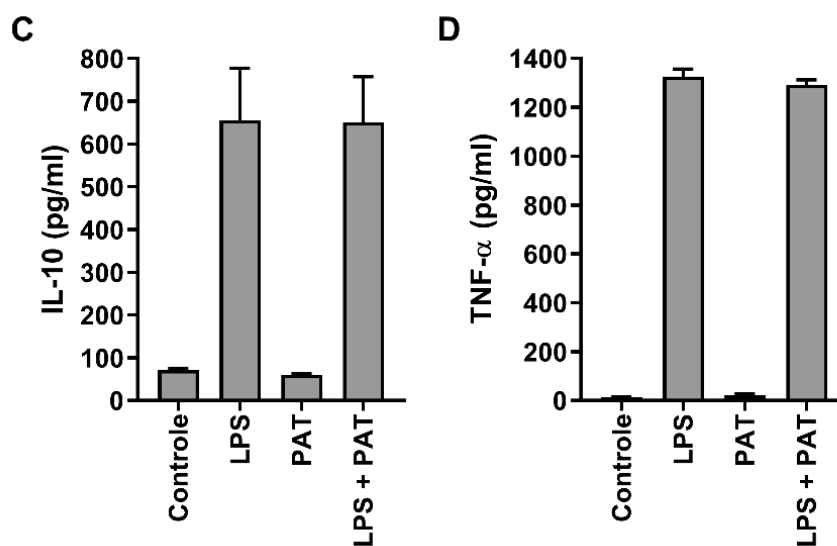
Os macrófagos ($n = 6$ em duplicata) foram tratados com LPS e PAT (250 ng/ml). Após 24 h de incubação, a expressão do mRNA do CD69 (A), COX-2 (B), IL-1 β (C) e iNOS (D) foi quantificada por RT-qPCR. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e analisados usando o software GraphPad Prism[®] versão 9.1.0 usando ANOVA *one-way* seguida do teste de Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS.

5.5 Efeito da PAT na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α

Como as citocinas modulam a produção de óxido nítrico (GELLER; BILLIAR, 1998; XIE *et al.*, 1992), foi avaliado se a PAT interfere na produção de citocinas anti-(IL-10) e pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) usando macrófagos estimulados com LPS. Como esperado, o LPS induziu um aumento significativo na produção de todas as citocinas avaliadas: IL-1 β (255,6 pg/ml), IL-6 (1.276,8 pg/ml), IL-10 (584,0 pg/ml) e TNF- α (1.313,6 pg/ml) (Figura 14 A, B, C e D, respectivamente). Contudo, a PAT (250 ng/ml) reduziu significativamente a produção da IL-1 β (80,6%) induzida pelo LPS.

Figura 14 – Efeito da PAT na produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α .



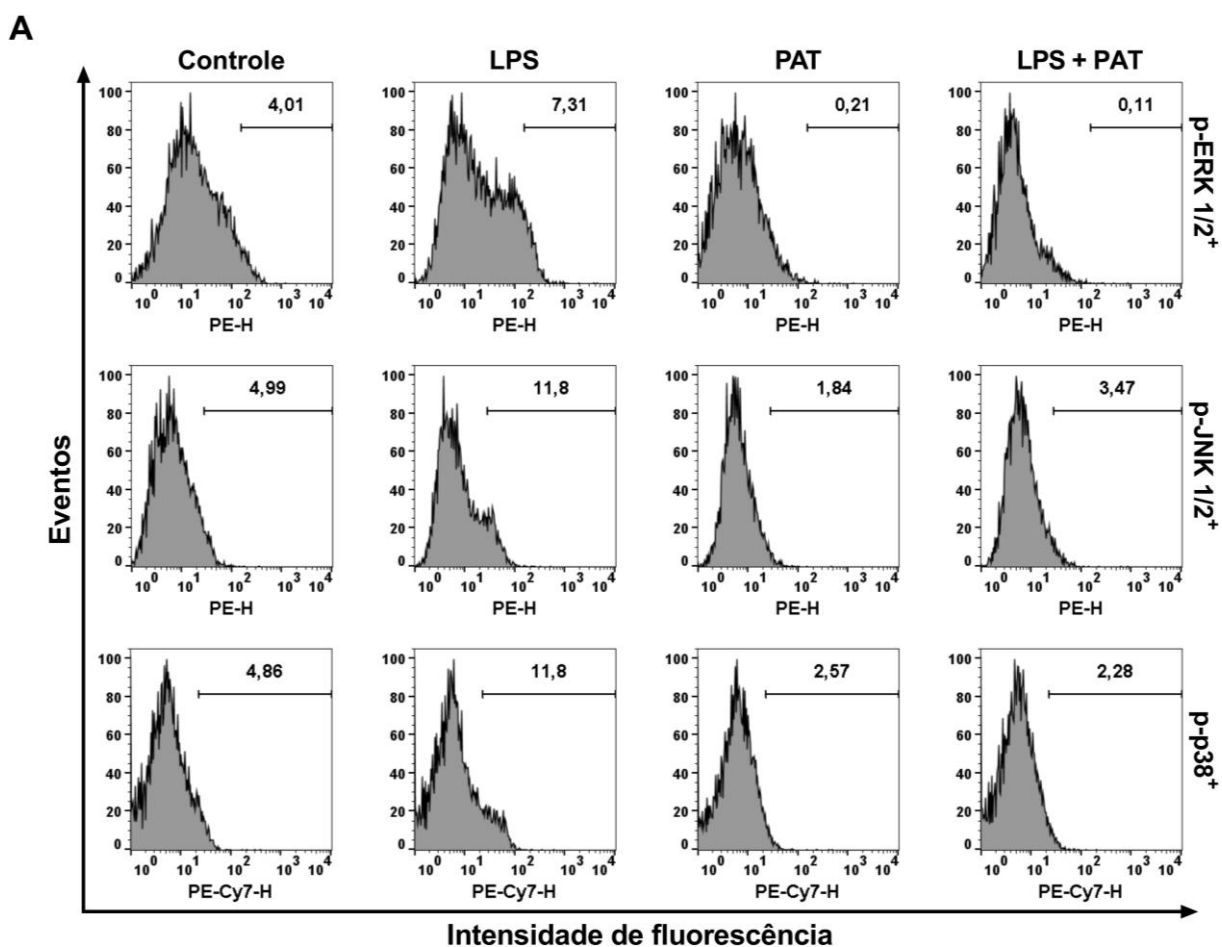


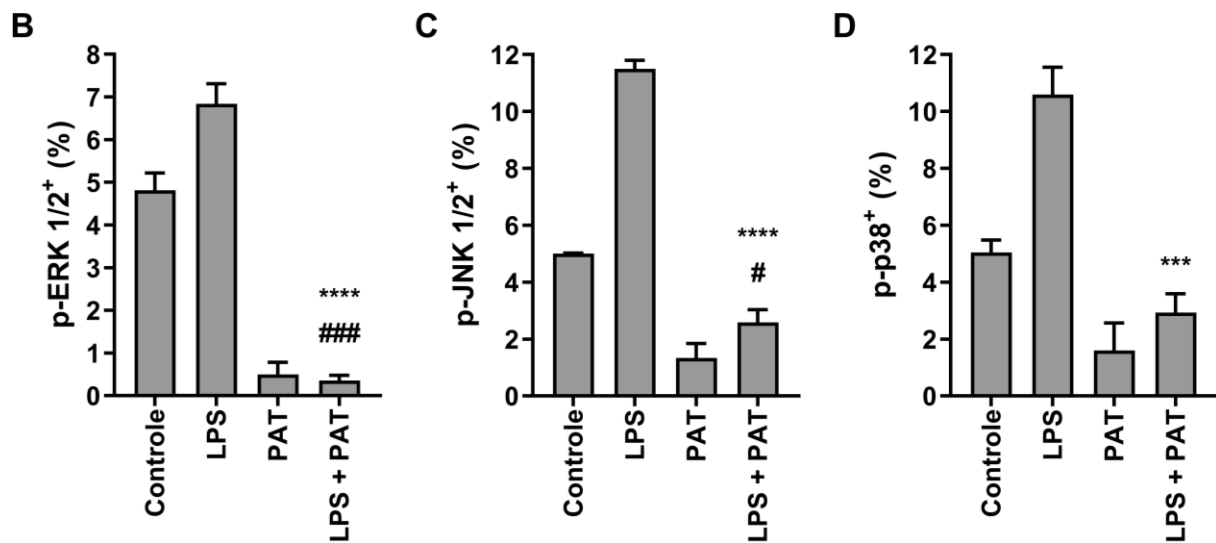
Os macrófagos ($n = 4$ em duplicata) foram tratados com LPS e PAT (250 ng/ml). Após 24 h de incubação, a produção de IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C) e TNF- α (D) foi determinada por ELISA. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 9.1.0 usando ANOVA *one-way* seguida do teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS.

5.6 Efeito da PAT na fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38

A via de sinalização das MAP quinases regula vários eventos durante o processo inflamatório, incluindo a produção de óxido nítrico (RAMACHANDRAN; LUPFER; ZAKI, 2018). Para investigar o mecanismo de ação da PAT, foi realizada a análise da fosforilação de ERK, JNK e p38. Como esperado, o LPS induziu um aumento significativo na fosforilação de todas as MAP quinases avaliadas (Figura 15 A, B, C e D, respectivamente). Em contraste, a PAT (250 ng/ml) reduziu significativamente a fosforilação da ERK (89,5%), JNK (77,5%) e p38 (72,3%) nos macrófagos estimulados.

Figura 15 – Efeito da PAT na fosforilação das MAP quinases ERK, JNK e p38.





Os macrófagos ($n = 4$) foram tratados com LPS e PAT (250 ng/ml). Após 24 h de incubação, os histogramas de fluorescência representativos (A) e a fosforilação de p-ERK 1/2⁺ (B), p-JNK 1/2⁺ (C) e p-p38⁺ (D) foram avaliados por citometria de fluxo. Os dados da citometria de fluxo foram analisados usando o software FlowJo® X versão 10.6.2. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM e analisados usando o software GraphPad Prism® versão 9.1.0 usando ANOVA *one-way* seguida do teste de Tukey. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado com o grupo LPS e # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ comparado com o grupo controle.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou, pela primeira vez, que a PAT inibe a produção de óxido nítrico induzida por LPS ao suprimir a via de sinalização CD69-TLR4/MAP quinases ERK-JNK-p38/Nos2/iNOS em macrófagos peritoneais murinos. Para melhor entender o mecanismo de sinalização da PAT, foi usado o modelo de cultura primária de macrófagos peritoneais murinos elicitados por tioglicolato. A injeção intraperitoneal de tioglicolato gera um microambiente que elicitava uma grande quantidade de macrófagos, aproximadamente 2×10^7 , que, após elicitados, podem ser coletados e usados em protocolos experimentais *in vitro*. Esses macrófagos existem como células não aderentes *in situ* e, quando cultivados *in vitro*, podem ser separados por aderência em plástico (LU; VARLEY, 2013; RIOS; TOUYZ; MONTEZANO, 2017).

O ensaio de viabilidade celular mostrou que a PAT, em concentrações de até 250 ng/ml, não afetou a viabilidade dos macrófagos. Esse resultado está de acordo com os obtidos por Bourdiol *et al.* (1990) quando ao utilizar macrófagos peritoneais murinos residentes e Tsai *et al.* (2016) com macrófagos murinos RAW264.7. Por outro lado, macrófagos bovinos parecem ser mais sensíveis a PAT, como mostrado por Oh *et al.* (2012). Esses diferentes efeitos da PAT na viabilidade celular podem estar associados a mudanças bioquímicas, morfológicas e funcionais que podem ocorrer durante a imortalização celular (RAZIN; CEDAR, 1991; TOMMASI *et al.*, 2013).

Os macrófagos são derivados de fagócitos mononucleares, os quais são gerados na medula óssea e, então, liberados na corrente sanguínea (OKABE; MEDZHITOV, 2016; ZHAO *et al.*, 2018). Os macrófagos desempenham várias funções, como a produção de óxido nítrico, um dos eventos mais proeminentes durante a fase aguda da inflamação (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; MONCADA, 1999). Dessa forma, para investigar o efeito da PAT no processo inflamatório agudo, foi usado o LPS para induzir a produção de óxido nítrico nos macrófagos (RAETZ; WHITFIELD, 2002). O LPS é um conhecido ativador de macrófagos, capaz de desencadear uma vigorosa produção de óxido nítrico (DALBY, 2018). Como resultado, a PAT reduziu a produção do óxido nítrico induzida pelo LPS de uma forma dependente de concentração. Este resultado é consistente com os obtidos por Tsai *et al.* (2016). Além disso, um resultado similar foi relatado por Mayer *et al.* (2017), os quais observaram que o desoxinivalenol, outro produto natural derivado de fungo, reduziu a produção de óxido nítrico nas mesmas condições.

O óxido nítrico é sintetizado pela NOS, uma família de enzimas que converte L-arginina e oxigênio molecular em *N*^ω-hidroxi-L-arginina e posteriormente em citrulina e óxido nítrico. Em mamíferos, há 3 isoformas de NOS. Notavelmente, embora todas as isoformas conhecidas de NOS catalisem a mesma reação, a iNOS é a principal isoforma envolvida na inflamação (KLEINERT; SCHWARZ; FORSTERMANN, 2003; SCHINDLER; BOGDAN, 2001; STUEHR, 1999). Foi avaliado se a PAT pode reduzir a expressão de iNOS em macrófagos ativados por LPS. A análise de citometria de fluxo mostrou, pela primeira vez, que a PAT pode reduzir a expressão de iNOS dependente do LPS. Esse resultado corrobora a inibição da produção do óxido nítrico, observada no presente trabalho. Além disso, Ferrante *et al.* (2008) e Sugiyama *et al.* (2010) também descreveram que outros produtos derivados de fungos podem reduzir o óxido nítrico e a expressão de iNOS em macrófagos ativados por LPS. Juntos, esses resultados sugerem que a expressão reduzida da iNOS após o tratamento com a PAT pode explicar parcialmente a inibição da produção do óxido nítrico.

Uma vez que a iNOS foi expressa, ela produz continuamente óxido nítrico até que a enzima seja degradada. Portanto, a atividade da iNOS é regulada principalmente por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (KLEINERT; SCHWARZ; FORSTERMANN, 2003; MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; NATHAN; XIE, 1994a). Por essa razão, foi quantificada a expressão do mRNA da iNOS. Como resultado, a PAT inibiu completamente a expressão do mRNA da iNOS induzida pelo LPS. Pela primeira vez, o efeito da PAT na via do óxido nítrico foi expandido até o nível do mRNA. Além disso, resultados similares também foram relatados por Seeboth *et al.* (2012), os quais mostraram que um outro produto derivado de fungo, a toxina T-2, reduz tanto a expressão do mRNA da iNOS quanto a produção de óxido nítrico em macrófagos alveolares suínos primários.

Além do óxido nítrico, muitos mediadores coordenam os eventos iniciais da inflamação aguda, como as citocinas anti- e pró-inflamatórias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Essas citocinas atuam de forma autócrina, parácrina e até mesmo endócrina ligando-se a receptores na superfície celular dos macrófagos para modular a produção de óxido nítrico. Geralmente, as citocinas anti-inflamatórias regulam negativamente a produção de óxido nítrico, enquanto as citocinas pró-inflamatórias regulam positivamente (CHESROWN *et al.*, 1994; GELLER; BILLIAR, 1998; NATHAN, 1992; NATHAN; XIE, 1994b; PERRELLA *et al.*, 1996; PERRELLA *et al.*, 1994; XIE *et al.*, 1992). A respeito disso, foi avaliada a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e

das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em macrófagos. Foi visto que a PAT reduziu a produção da IL-1 β , embora a expressão do mRNA da IL-1 β tenha sido regulado positivamente na presença do LPS.

A citocina IL-1 β é primeiro sintetizada como um precursor citoplasmático (pró-IL-1 β) e, então, clivada para gerar a forma madura (IL-1 β), que é secretada para o meio extracelular e realiza várias funções pró-inflamatórias. A clivagem da IL-1 β é controlada no nível pós-traducional por maturação proteolítica dependente de inflamassoma. Os inflamassomas são complexos multiproteicos citosólicos que se formam em resposta a DAMP e PAMP. Na ativação canônica, o inflamassoma induz a ativação de caspases pró-inflamatórias, principalmente a caspase-1, que clivam a pró-IL-1 β , gerando a IL-1 β (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010; RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012; WALSH; MURUVE; POWER, 2014). Os inflamassomas murinos requerem uma ativação em duas etapas. O primeiro sinal (*priming*) ativa a expressão da pró-IL-1 β e da caspase-1 e o segundo sinal (*driving*) promove a clivagem da pró-IL-1 β pela protease caspase-1 (GAIDT *et al.*, 2016; HUGHES; O'NEILL, 2018). Assim, a redução da produção da IL-1 β após o tratamento com a PAT pode estar relacionada ao comprometimento da maturação dependente de inflamassoma/caspase-1. Esta hipótese é apoiada por evidências de Tsai *et al.* (2016), que mostraram que a PAT bloqueou a expressão de caspase-1 e inflamassoma NLRP3, bem como a produção de IL-1 β , em macrófagos J774.1. Além disso, a regulação negativa da via do óxido nítrico, observada no presente trabalho, pode estar relacionada aos níveis reduzidos da IL-1 β , uma vez que ela é um dos indutores da produção de óxido nítrico (PERRELLA *et al.*, 1996; PERRELLA *et al.*, 1994).

Por outro lado, há uma modulação mútua entre as vias da COX e da NOS. A COX é modulada pelo óxido nítrico, enquanto a NOS é modulada pelos prostanoídes, o produto da oxidação do ácido araquidônico catalisada pela COX. Assim como a família NOS, a família COX consiste em isoformas constitutiva (COX-1) e induzida (COX-2) (ALEXANIAN; SOROKIN, 2017; SALVEMINI, 1997; SALVEMINI; KIM; MOLLACE, 2013; SALVEMINI *et al.*, 1993; SOROKIN, 2016). Uma vez que a interação entre essas vias se estende aos níveis transcricional e pós-transcricional (SOROKIN, 2016), foi avaliado o efeito da PAT na expressão do mRNA da COX-2 induzida por LPS e a superexpressão desse mRNA foi reduzida. Portanto, pode haver

uma regulação negativa mútua das vias da COX e da NOS induzida pela PAT que contribui para o comprometimento da produção do óxido nítrico.

Além disso, foi relatado que o *crosstalk* do CD69 induz uma forte produção de óxido nítrico em monócitos humanos (DE MARIA *et al.*, 1994). Nesse contexto, Marzio *et al.* (1997) demonstraram que macrófagos murinos também apresentam um aumento significativo na produção de óxido nítrico quando estimulados com o anticorpo monoclonal anti-CD69. O CD69 é um receptor de lectina do tipo C ligado à membrana celular regulado positivamente após a ativação dos macrófagos (CIBRIAN; SANCHEZ-MADRID, 2017; SANCHO; GOMEZ; SANCHEZ-MADRID, 2005). Então, foi estudado o efeito da PAT na expressão da proteína e do mRNA do CD69 após a estimulação com LPS. A análise de citometria de fluxo mostrou que a PAT reduziu a expressão do CD69 dependente do LPS, embora a expressão do mRNA não tenha sido afetada. Dessa forma, os dados sugerem que a PAT poderia atuar impedindo o transporte do CD69 para a superfície celular. Contudo, a disponibilidade reduzida do CD69 na superfície celular poderia maximizar a supressão da via do óxido nítrico, uma vez que a estimulação do CD69 ativa a via supracitada (DE MARIA *et al.*, 1994; MARZIO *et al.*, 1997).

Além do CD69, o TLR4 é outro receptor ligado à membrana celular que desencadeia uma robusta produção de óxido nítrico quando estimulado. O TLR4 é um membro da família TLR que é ativado pelo LPS (PARK; LEE, 2013). O TLR4 transmite o sinal de reconhecimento do agonista para estimular a produção de óxido nítrico por vias de sinalização intracelular, como a via das MAP quinases (KAWAI; AKIRA, 2007; KUZMICH *et al.*, 2017; RAMACHANDRAN; LUPFER; ZAKI, 2018). A análise de citometria de fluxo mostrou que a PAT reduziu a expressão da proteína TLR4, mas não do mRNA (dados não mostrados), na presença do LPS. De forma análoga ao CD69, a disponibilidade reduzida do TLR4 na superfície celular poderia maximizar a supressão da via do óxido nítrico. Além disso, a regulação negativa do TLR4 sugere que os componentes *downstream* da via do TLR4, como as MAP quinases, também serão afetados.

Em mamíferos, as MAP quinases incluem três serina/treonina quinases em várias isoformas: ERK 1-8, JNK 1-3 e p38- α , - β , - γ e - δ . Essas quinases regulam várias atividades celulares, como apoptose, diferenciação, imunidade, inflamação e proliferação. As MAP quinases ativadas fosforilam diversas proteínas alvo, como os fatores de transcrição, que levam à expressão de genes alvos, como o *Nos2*, um dos

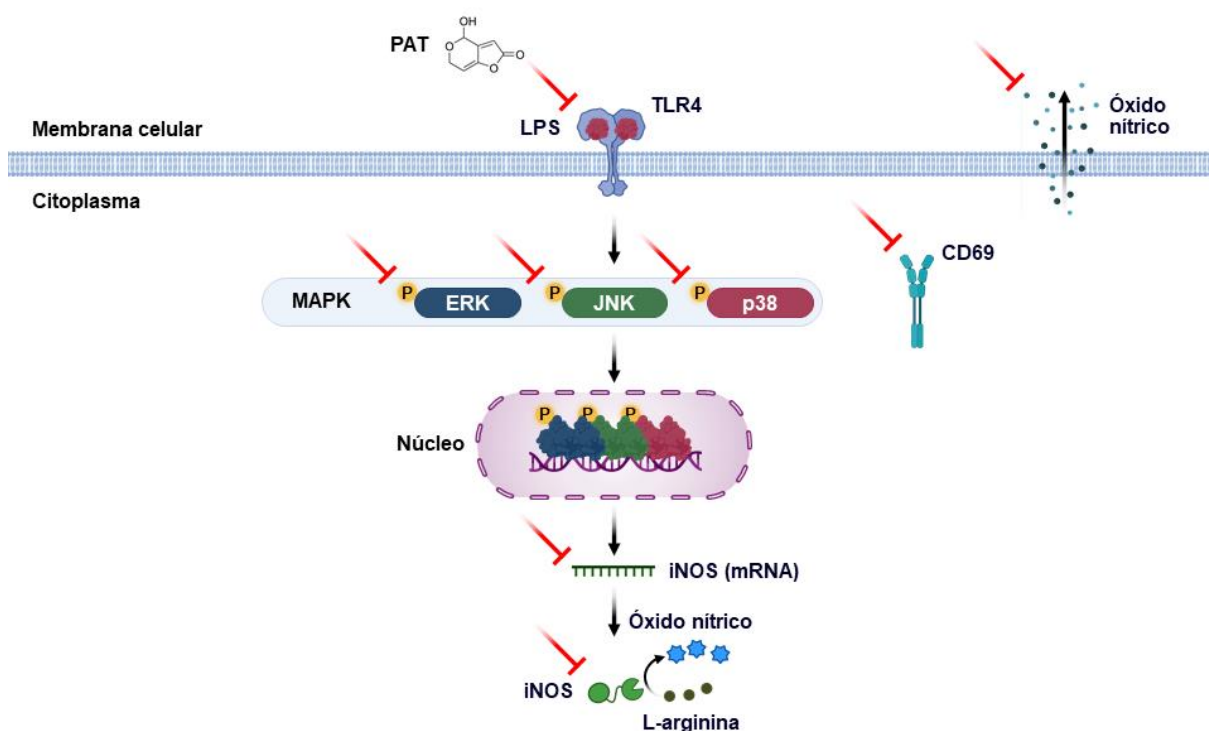
genes envolvidos na produção do óxido nítrico (KIM; CHOI, 2010, 2015). Para examinar o efeito da PAT na via das MAP quinases, foi avaliado a fosforilação das três MAP quinases (ERK, JNK e p38). A análise de citometria de fluxo mostrou que a PAT reduziu a fosforilação induzida pelo LPS de todas as MAP quinases avaliadas (ERK, JNK e p38). Portanto, a redução da produção do óxido nítrico pode ser uma consequência da regulação negativa da fosforilação das MAP quinases. Esta hipótese é apoiada pela observação de que vários inibidores de MAP quinases bloqueiam a produção de óxido nítrico também bloqueiam a expressão da iNOS (mRNA e proteína) (AJIZIAN; ENGLISH; MEALS, 1999; CHAN; RICHES, 2001; CHOI *et al.*, 2011; LAHTI *et al.*, 2000; QU *et al.*, 2017; WAAK *et al.*, 2009).

Em conjunto, esses dados mostram, pela primeira vez, a ação anti-inflamatória da PAT em cultura primária de macrófagos peritoneais murinos. Além disso, o presente trabalho detalha o mecanismo de ação da PAT na inibição da produção de óxido nítrico induzida por LPS, sugerindo a seguinte via de sinalização: CD69-TLR4/MAP quinases ERK-JNK-p38/Nos2/iNOS.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, esses dados inéditos sugerem que a PAT suprime a resposta inflamatória aguda ao inibir a produção de óxido nítrico, inibindo elementos centrais desta via, como o TLR4, as MAP quinases ERK, JNK e p38, o mRNA que codifica a iNOS, a proteína iNOS e, por fim, a produção do óxido nítrico em macrófagos peritoneais murinos. Além disso, vias relacionadas, como o CD69, também foram suprimidas pela patulina, sugerindo um novo modo de ação para esta substância. Assim, a PAT pode se tornar uma ferramenta farmacológica promissora para o controle da inflamação, capaz de inibir completamente a via do óxido nítrico.

Figura 16 – Patulina inibe a produção de óxido nítrico induzida por LPS ao suprimir a via de sinalização das MAP quinases.



Fonte: Produção do próprio autor.

REFERÊNCIAS

AJIZIAN, S. J.; ENGLISH, B. K.; MEALS, E. A. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon- γ . **J Infect Dis**, v. 179, n. 4, p. 939-944, 1999. DOI 10.1086/314659.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006. DOI 10.1016/j.cell.2006.02.015.

AL-SHEHRI, S. S. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. **Biochimie**, v. 181, p. 52-64, 2021. DOI 10.1016/j.biochi.2020.11.022.

ALEXANIAN, A.; SOROKIN, A. Cyclooxygenase 2: protein-protein interactions and posttranslational modifications. **Physiol Genomics**, v. 49, n. 11, p. 667-681, 2017. DOI 10.1152/physiolgenomics.00086.2017.

ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 787-820, 2007. DOI 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090529.

AMANO, S. **Fundamentals of hematology**. Tokyo: Maruzen, 1948.

AOKI, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 33, n. 6, p. 304-311, 2012. DOI 10.1016/j.tips.2012.02.004.

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 5276130, 2016. DOI 10.1155/2016/5276130.

ASCHOFF, L. Das reticulo-endotheliale System. (Ed.). **Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde**. Springer, 1924.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; INTERNATIONAL NATURAL PRODUCT SCIENCES, T.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021. DOI 10.1038/s41573-020-00114-z.

AZEVEDO, M.; LISBOA, C.; RODRIGUES, A. Chronic wounds and novel therapeutic approaches. **Br J Community Nurs**, v. 25, n. Sup12, p. S26-S32, 2020. DOI 10.12968/bjcn.2020.25.Sup12.S26.

BACCHI, S.; PALUMBO, P.; SPONTA, A.; COPPOLINO, M. F. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**, v. 11, n. 1, p. 52-64, 2012. DOI 10.2174/187152312803476255.

BEHZADI, P.; GARCIA-PERDOMO, H. A.; KARPINSKI, T. M. Toll-like receptors: general molecular and structural biology. **J Immunol Res**, v. 2021, p. 9914854, 2021. DOI 10.1155/2021/9914854.

BENAROYO, L. How do we define inflammation? **Praxis (Bern 1994)**, v. 83, n. 48, p. 1343-1347, 1994.

BERGMAN, P. J. Anticancer vaccines. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 37, n. 6, p. 1111-1119; vi-ii, 2007. DOI 10.1016/j.cvs.2007.06.005.

BEUTLER, B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 270, p. 109-120, 2002. DOI 10.1007/978-3-642-59430-4_7.

BEUTLER, B.; DU, X.; POLTORAK, A. Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies. **J Endotoxin Res**, v. 7, n. 4, p. 277-280, 2001.

BHATTACHARYYA, S.; MIDWOOD, K. S.; YIN, H.; VARGA, J. Toll-Like receptor-4 signaling drives persistent fibroblast activation and prevents fibrosis resolution in scleroderma. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 6, n. 10, p. 356-369, 2017. DOI 10.1089/wound.2017.0732.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 6, p. 1-32, 2016. DOI 10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016.

BIRKINSHAW, J. H.; BRACKEN, A.; MICHAEL, S. E.; RAISTRICK, H. Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier: ii. biochemistry and chemistry. **Lancet**, v. 242, n. 6273, p. 625-630, 1943. DOI 10.1016/s0140-6736(00)88177-5.

BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729-733, 1997. DOI 10.1038/385729a0.

BODMER, J. L.; SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. **Trends Biochem Sci**, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2002. DOI 10.1016/s0968-0004(01)01995-8.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001. DOI 10.1038/ni1001-907.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends Immunol**, v. 36, n. 3, p. 161-178, 2015. DOI 10.1016/j.it.2015.01.003.

BONHAM, K. S.; ORZALLI, M. H.; HAYASHI, K.; WOLF, A. I.; GLANEMANN, C.; WENINGER, W.; IWASAKI, A.; KNIPE, D. M.; KAGAN, J. C. A promiscuous lipid-

binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. **Cell**, v. 156, n. 4, p. 705-716, 2014. DOI 10.1016/j.cell.2014.01.019.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S33-40, 2010. DOI 10.1016/j.jaci.2009.09.017.

BOURDIOL, D.; ESCOULA, L.; SALVAYRE, R. Effect of patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. **Food Chem Toxicol**, v. 28, n. 1, p. 29-33, 1990. DOI 10.1016/0278-6915(90)90132-7.

BOWERS, S.; FRANCO, E. Chronic wounds: evaluation and management. **Am Fam Physician**, v. 101, n. 3, p. 159-166, 2020.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008. DOI 10.1002/path.2287.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**, 2013.

BROGGI, A.; GRANUCCI, F. Microbe- and danger-induced inflammation. **Mol Immunol**, v. 63, n. 2, p. 127-133, 2015. DOI 10.1016/j.molimm.2014.06.037.

BROWN, T. M.; FEE, E. Rudolf Carl Virchow: medical scientist, social reformer, role model. **Am J Public Health**, v. 96, n. 12, p. 2104-2105, 2006. DOI 10.2105/AJPH.2005.078436.

BURMEISTER, A. R.; MARRIOTT, I. The interleukin-10 family of cytokines and their role in the CNS. **Front Cell Neurosci**, v. 12, p. 458, 2018. DOI 10.3389/fncel.2018.00458.

CHALMERS, I.; CLARKE, M. Commentary: the 1944 patulin trial: the first properly controlled multicentre trial conducted under the aegis of the British Medical Research Council. **Int J Epidemiol**, v. 33, n. 2, p. 253-260, 2004. DOI 10.1093/ije/dyh162.

CHAN, E. D.; RICHES, D. W. IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38^{mapk} in a mouse macrophage cell line. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 280, n. 3, p. C441-450, 2001. DOI 10.1152/ajpcell.2001.280.3.C441.

CHANNON, K. M.; GUZIK, T. J. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. **J Physiol Pharmacol**, v. 53, n. 4 Pt 1, p. 515-524, 2002.

CHESROWN, S. E.; MONNIER, J.; VISNER, G.; NICK, H. S. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF- γ , TGF- β , and IL-10 in murine

macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 200, n. 1, p. 126-134, 1994. DOI 10.1006/bbrc.1994.1424.

CHOI, E. Y.; JIN, J. Y.; LEE, J. Y.; CHOI, J. I.; CHOI, I. S.; KIM, S. J. Melatonin inhibits *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and interleukin-6 in murine macrophages by suppressing NF- κ B and STAT1 activity. **J Pineal Res**, v. 50, n. 2, p. 197-206, 2011. DOI 10.1111/j.1600-079X.2010.00829.x.

CHOPRA, B.; DHINGRA, A. K. Natural products: a lead for drug discovery and development. **Phytother Res**, v. 35, n. 9, p. 4660-4702, 2021. DOI 10.1002/ptr.7099.

CIBRIAN, D.; SANCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **Eur J Immunol**, v. 47, n. 6, p. 946-953, 2017. DOI 10.1002/eji.201646837.

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cell Mol Life Sci**, v. 78, n. 4, p. 1233-1261, 2021. DOI 10.1007/s00018-020-03656-y.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001. DOI 10.1016/s1567-5769(01)00086-8.

COLOTTA, F.; RE, F.; MUZIO, M.; BERTINI, R.; POLENTARUTTI, N.; SIRONI, M.; GIRI, J. G.; DOWER, S. K.; SIMS, J. E.; MANTOVANI, A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. **Science**, v. 261, n. 5120, p. 472-475, 1993. DOI 10.1126/science.8332913.

CONTI, B.; TABAREAN, I.; ANDREI, C.; BARTFAI, T. Cytokines and fever. **Front Biosci**, v. 9, p. 1433-1449, 2004. DOI 10.2741/1341.

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiogenesis**, v. 10, n. 3, p. 149-166, 2007. DOI 10.1007/s10456-007-9074-0.

DA SILVA CORREIA, J.; SOLDAU, K.; CHRISTEN, U.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. **J Biol Chem**, v. 276, n. 24, p. 21129-21135, 2001. DOI 10.1074/jbc.M009164200.

DALBY, E. Activating murine macrophages in vitro. **Methods Mol Biol**, v. 1784, p. 111-117, 2018. DOI 10.1007/978-1-4939-7837-3_11.

DAVIES, L. C.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages: then and now. **Immunology**, v. 144, n. 4, p. 541-548, 2015. DOI 10.1111/imm.12451.

DE MARIA, R.; CIFONE, M. G.; TROTTA, R.; RIPPO, M. R.; FESTUCCIA, C.; SANTONI, A.; TESTI, R. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. **J Exp Med**, v. 180, n. 5, p. 1999-2004, 1994. DOI 10.1084/jem.180.5.1999.

DE OLIVEIRA, C. M.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMAO, R. Cytokines and pain. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255-259, 260-255, 137-242, 2011. DOI 10.1016/S0034-7094(11)70029-0.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000. DOI 10.1056/NEJM200007063430107.

DHILLON, A. S.; HAGAN, S.; RATH, O.; KOLCH, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, 2007. DOI 10.1038/sj.onc.1210421.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, n. 4, p. 253-265, 1997. DOI 10.1016/s1359-6101(97)00023-3.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37 Suppl 1, p. S34-45, 2007. DOI 10.1002/eji.200737772.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 8-27, 2018. DOI 10.1111/imr.12621.

EBERT, R.; FLOREY, H. The extravascular development of the monocyte observed in vivo. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 20, n. 4, p. 342, 1939.

ELGAZZAR, A. H. **The pathophysiologic basis of nuclear medicine**. 3 Ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2006.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 2014. DOI 10.1016/j.immuni.2014.06.013.

ESCOULA, L.; BOURDIOL, D.; LINAS, M. D.; RECCO, P.; SEGUELA, J. P. Enhancing resistance and modulation of humoral immune response to experimental *Candida albicans* infection by patulin. **Mycopathologia**, v. 103, n. 3, p. 153-156, 1988a. DOI 10.1007/BF00436814.

ESCOULA, L.; THOMSEN, M.; BOURDIOL, D.; PIPY, B.; PEURIERE, S.; ROUBINET, F. Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. **Int J Immunopharmacol**, v. 10, n. 8, p. 983-989, 1988b. DOI 10.1016/0192-0561(88)90045-8.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; LEITE, J. A.; DANTAS, B. B.; LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; ARAUJO, D. A. M. Morita-baylis-hillman adducts display anti-inflammatory effects by modulating inflammatory mediator expression in RAW264.7 cells. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 6898505, 2017. DOI 10.1155/2017/6898505.

- FARZI, R.; AGHBASH, P. S.; ESLAMI, N.; AZADI, A.; SHAMEKH, A.; HEMMAT, N.; ENTEZARI-MALEKI, T.; BAGHI, H. B. The role of antigen-presenting cells in the pathogenesis of COVID-19. **Pathol Res Pract**, v. 233, p. 153848, 2022. DOI 10.1016/j.prp.2022.153848.
- FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front Biosci**, v. 2, p. d12-26, 1997. DOI 10.2741/a171.
- FERRANTE, M. C.; RASO, G. M.; BILANCIONE, M.; ESPOSITO, E.; IACONO, A.; MELI, R. Differential modification of inflammatory enzymes in J774A.1 macrophages by ochratoxin A alone or in combination with lipopolysaccharide. **Toxicol Lett**, v. 181, n. 1, p. 40-46, 2008. DOI 10.1016/j.toxlet.2008.06.866.
- FERRAO, R.; ZHOU, H.; SHAN, Y.; LIU, Q.; LI, Q.; SHAW, D. E.; LI, X.; WU, H. IRAK4 dimerization and *trans*-autophosphorylation are induced by Myddosome assembly. **Mol Cell**, v. 55, n. 6, p. 891-903, 2014. DOI 10.1016/j.molcel.2014.08.006.
- FILEP, J. G. Resolution of inflammation: leukocytes and molecular pathways as potential therapeutic targets. **Front Immunol**, v. 4, p. 256, 2013. DOI 10.3389/fimmu.2013.00256.
- FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170, n. 6, p. 2081-2095, 1989. DOI 10.1084/jem.170.6.2081.
- FITZGERALD, K. A.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; BOWIE, A. G.; JEFFERIES, C. A.; MANSELL, A. S.; BRADY, G.; BRINT, E.; DUNNE, A.; GRAY, P.; HARTE, M. T.; MCMURRAY, D.; SMITH, D. E.; SIMS, J. E.; BIRD, T. A.; O'NEILL, L. A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 78-83, 2001. DOI 10.1038/35092578.
- FITZNER, N.; CLAUBERG, S.; ESSMANN, F.; LIEBMANN, J.; KOLB-BACHOFEN, V. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 1, p. 138-146, 2008. DOI 10.1128/CVI.00257-07.
- FRANK, H. K. Occurrence of patulin in fruit and vegetables. **Ann Nutr Aliment**, v. 31, n. 4-6, p. 459-465, 1977.
- FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005. DOI 10.2174/1568010054022024.
- GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 4, p. 232-241, 2010. DOI 10.1038/nrrheum.2010.4.
- GAIDT, M. M.; EBERT, T. S.; CHAUHAN, D.; SCHMIDT, T.; SCHMID-BURGK, J. L.; RAPINO, F.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A.; GRAF, T.; HORNUNG, V. Human monocytes engage an alternative inflammasome pathway. **Immunity**, v. 44, n. 4, p. 833-846, 2016. DOI 10.1016/j.immuni.2016.01.012.

GAY, N. J.; KEITH, F. J. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. **Nature**, v. 351, n. 6325, p. 355-356, 1991. DOI 10.1038/351355b0.

GELLER, D. A.; BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Rev**, v. 17, n. 1, p. 7-23, 1998. DOI 10.1023/a:1005940202801.

GINSBURG, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. 171-179, 2002. DOI 10.1016/s1473-3099(02)00226-8.

GIOANNINI, T. L.; TEGHANEMT, A.; ZHANG, D.; LEVIS, E. N.; WEISS, J. P. Monomeric endotoxin: protein complexes are essential for TLR4-dependent cell activation. **J Endotoxin Res**, v. 11, n. 2, p. 117-123, 2005. DOI 10.1179/096805105X35198.

GORDON, S. Phagocytosis: an immunobiologic process. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 463-475, 2016. DOI 10.1016/j.immuni.2016.02.026.

GORDON, S.; PLUDDMANN, A. Macrophage clearance of apoptotic cells: a critical assessment. **Front Immunol**, v. 9, p. 127, 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.00127.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „ueber einige azoverbindungen“. **Ber Dtsch Chem Ges**, v. 12, n. 1, p. 426-428, 1879. DOI 10.1002/cber.187901201117.

GUVEN-MAIOROV, E.; KESKIN, O.; GURSOY, A.; VANWAES, C.; CHEN, Z.; TSAI, C. J.; NUSSINOV, R. The architecture of the TIR domain signalosome in the Toll-like receptor-4 signaling pathway. **Sci Rep**, v. 5, p. 13128, 2015. DOI 10.1038/srep13128.

GUZIK, T. J.; WEST, N. E.; PILLAI, R.; TAGGART, D. P.; CHANNON, K. M. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. **Hypertension**, v. 39, n. 6, p. 1088-1094, 2002. DOI 10.1161/01.hyp.0000018041.48432.b5.

HAILMAN, E.; LICHENSTEIN, H. S.; WURFEL, M. M.; MILLER, D. S.; JOHNSON, D. A.; KELLEY, M.; BUSSE, L. A.; ZUKOWSKI, M. M.; WRIGHT, S. D. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. **J Exp Med**, v. 179, n. 1, p. 269-277, 1994. DOI 10.1084/jem.179.1.269.

HALLETT, M. B. An introduction to phagocytosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 1246, p. 1-7, 2020. DOI 10.1007/978-3-030-40406-2_1.

HANLEY, W. D.; WIRTZ, D.; KONSTANTOPOULOS, K. Distinct kinetic and mechanical properties govern selectin-leukocyte interactions. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 12, p. 2503-2511, 2004. DOI 10.1242/jcs.01088.

HARDING, C. V.; CANADAY, D.; RAMACHANDRA, L. Choosing and preparing antigen-presenting cells. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 16, p. Unit 16 11, 2010. DOI 10.1002/0471142735.im1601s88.

HARINGTON, C. R. The work of the National Institute for Medical Research. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 136, n. 884, p. 333-348, 1949.

HEGUY, A.; BALDARI, C. T.; MACCHIA, G.; TELFORD, J. L.; MELLI, M. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the *Drosophila* toll protein are essential for IL-1R signal transduction. **J Biol Chem**, v. 267, n. 4, p. 2605-2609, 1992.

HIBI, M.; MURAKAMI, M.; SAITO, M.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1149-1157, 1990. DOI 10.1016/0092-8674(90)90411-7.

HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 1, 2017. DOI 10.3390/ijms19010092.

HIROTA, N.; MARTIN, J. G. Mechanisms of airway remodeling. **Chest**, v. 144, n. 3, p. 1026-1032, 2013. DOI 10.1378/chest.12-3073.

HORNG, T.; BARTON, G. M.; FLAVELL, R. A.; MEDZHITOV, R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 329-333, 2002. DOI 10.1038/nature01180.

HOSSEINI, A.; HASHEMI, V.; SHOMALI, N.; ASGHARI, F.; GHARIBI, T.; AKBARI, M.; GHOLIZADEH, S.; JAFARI, A. Innate and adaptive immune responses against coronavirus. **Biomed Pharmacother**, v. 132, p. 110859, 2020. DOI 10.1016/j.biopha.2020.110859.

HUGHES, M. M.; O'NEILL, L. A. J. Metabolic regulation of NLRP3. **Immunol Rev**, v. 281, n. 1, p. 88-98, 2018. DOI 10.1111/imr.12608.

HUME, D. A.; IRVINE, K. M.; PRIDANS, C. The mononuclear phagocyte system: the relationship between monocytes and macrophages. **Trends Immunol**, v. 40, n. 2, p. 98-112, 2019. DOI 10.1016/j.it.2018.11.007.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat Immunol**, v. 16, n. 5, p. 448-457, 2015. DOI 10.1038/ni.3153.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microsc Res Tech**, v. 50, n. 3, p. 184-195, 2000. DOI 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.

IOVINE, N.; EASTVOLD, J.; ELSBACH, P.; WEISS, J. P.; GIOANNINI, T. L. The carboxyl-terminal domain of closely related endotoxin-binding proteins determines the target of protein-lipopolysaccharide complexes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 10, p. 7970-7978, 2002. DOI 10.1074/jbc.M109622200.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett**, v. 364, n. 3, p. 279-282, 1995. DOI 10.1016/0014-5793(95)00307-u.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 343-353, 2015. DOI 10.1038/ni.3123.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002. DOI 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

KAGAN, J. C.; MEDZHITOV, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 943-955, 2006. DOI 10.1016/j.cell.2006.03.047.

KANG, S.; NARAZAKI, M.; METWALLY, H.; KISHIMOTO, T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. **J Exp Med**, v. 217, n. 5, 2020. DOI 10.1084/jem.20190347.

KAUR, B. P.; SECORD, E. Innate immunity. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 41, n. 4, p. 535-541, 2021. DOI 10.1016/j.iac.2021.07.003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Semin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 24-32, 2007. DOI 10.1016/j.smim.2006.12.004.

KELLEY, S. L.; LUKK, T.; NAIR, S. K.; TAPPING, R. I. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. **J Immunol**, v. 190, n. 3, p. 1304-1311, 2013. DOI 10.4049/jimmunol.1202446.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 2010. DOI 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.

KIM, E. K.; CHOI, E. J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. **Arch Toxicol**, v. 89, n. 6, p. 867-882, 2015. DOI 10.1007/s00204-015-1472-2.

KIM, J. I.; LEE, C. J.; JIN, M. S.; LEE, C. H.; PAIK, S. G.; LEE, H.; LEE, J. O. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 11347-11351, 2005. DOI 10.1074/jbc.M414607200.

KIM, M.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. **Science**, v. 301, n. 5640, p. 1720-1725, 2003. DOI 10.1126/science.1084174.

KIM, S. J.; KIM, H. M. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. **BMB Rep**, v. 50, n. 2, p. 55-57, 2017. DOI 10.5483/bmbrep.2017.50.2.011.

KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. **Int Immunol**, v. 22, n. 5, p. 347-352, 2010. DOI 10.1093/intimm/dxq030.

KISHIMOTO, T.; HIBI, M.; MURAKAMI, M.; NARAZAKI, M.; SAITO, M.; TAGA, T. The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. **Ciba Found Symp**, v. 167, p. 5-16, 1992. DOI 10.1002/9780470514269.ch2.

KITCHENS, R. L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. **Chem Immunol**, v. 74, p. 61-82, 2000. DOI 10.1159/000058750.

KLEINERT, H.; SCHWARZ, P. M.; FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biol Chem**, v. 384, n. 10-11, p. 1343-1364, 2003. DOI 10.1515/BC.2003.152.

KOMAROVA, Y.; MALIK, A. B. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 463-493, 2010. DOI 10.1146/annurev-physiol-021909-135833.

KOURTZELIS, I.; HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation. **Front Immunol**, v. 11, p. 553, 2020. DOI 10.3389/fimmu.2020.00553.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011. DOI 10.3109/08830185.2010.529976.

KUNKEL, E. J.; LEY, K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. **Circ Res**, v. 79, n. 6, p. 1196-1204, 1996. DOI 10.1161/01.res.79.6.1196.

KUZMICH, N. N.; SIVAK, K. V.; CHUBAREV, V. N.; POROZOV, Y. B.; SAVATEEVA-LYUBIMOVA, T. N.; PERI, F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. **Vaccines (Basel)**, v. 5, n. 4, 2017. DOI 10.3390/vaccines5040034.

LAHTI, A.; LAHDE, M.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase suppresses endotoxin-induced nitric oxide synthesis in mouse macrophages and in human colon epithelial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 294, n. 3, p. 1188-1194, 2000.

LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 10, p. 607-632, 2020. DOI 10.1038/s41580-020-0255-7.

LEWIS, T. **Blood vessels of the human skin and their responses**. London: Shaw and Sons Ltd., 1927.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007. DOI 10.1038/nri2156.

LI, Z.; HE, X. C.; LI, L. Hematopoietic stem cells: self-renewal and expansion. **Curr Opin Hematol**, v. 26, n. 4, p. 258-265, 2019. DOI 10.1097/MOH.0000000000000506.

LIN, S. C.; LO, Y. C.; WU, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 885-890, 2010. DOI 10.1038/nature09121.

LOCATI, M.; CURTALE, G.; MANTOVANI, A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. **Annu Rev Pathol**, v. 15, p. 123-147, 2020. DOI 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.

LU, M.; VARLEY, A. W. Harvest and culture of mouse peritoneal macrophages. **Bio-protocol org**, v. 3, n. 22, p. 967-970, 2013.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008. DOI 10.1016/j.cyto.2008.01.006.

LUCAS, D. The bone marrow microenvironment for hematopoietic stem cells. (Ed.). **Stem Cell Microenvironments and Beyond**. 2017. ISBN 978-3-319-69193-0 978-3-319-69194-7.

LUM, L.; WONG, B. R.; JOSIEN, R.; BECHERER, J. D.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; SCHLONDORFF, J.; TEMPST, P.; CHOI, Y.; BLOBEL, C. P. Evidence for a role of a tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. **J Biol Chem**, v. 274, n. 19, p. 13613-13618, 1999. DOI 10.1074/jbc.274.19.13613.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-350, 1997. DOI 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.

MAHATO, D. K.; KAMLE, M.; SHARMA, B.; PANDHI, S.; DEVI, S.; DHAWAN, K.; SELVAKUMAR, R.; MISHRA, D.; KUMAR, A.; ARORA, S.; SINGH, N. A.; KUMAR, P. Patulin in food: a mycotoxin concern for human health and its management strategies. **Toxicon**, v. 198, p. 12-23, 2021. DOI 10.1016/j.toxicon.2021.04.027.

MANTOVANI, A.; LOCATI, M.; VECCHI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. **Trends Immunol**, v. 22, n. 6, p. 328-336, 2001. DOI 10.1016/s1471-4906(01)01941-x.

MARZIO, R.; JIRILLO, E.; RANSIJN, A.; MAUEL, J.; CORRADIN, S. B. Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 62, n. 3, p. 349-355, 1997. DOI 10.1002/jlb.62.3.349.

MAYER, E.; NOVAK, B.; SPRINGLER, A.; SCHWARTZ-ZIMMERMANN, H. E.; NAGL, V.; REISINGER, N.; HESSENBERGER, S.; SCHATZMAYR, G. Effects of deoxynivalenol (DON) and its microbial biotransformation product deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1) on a trout, pig, mouse, and human cell line. **Mycotoxin Res**, v. 33, n. 4, p. 297-308, 2017. DOI 10.1007/s12550-017-0289-7.

MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11 Suppl, p. S97-103, 1997.

MCGRATH, K. E.; FRAME, J. M.; PALIS, J. Early hematopoiesis and macrophage development. **Semin Immunol**, v. 27, n. 6, p. 379-387, 2015. DOI 10.1016/j.smim.2016.03.013.

MENG, F.; LOWELL, C. A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. **J Exp Med**, v. 185, n. 9, p. 1661-1670, 1997. DOI 10.1084/jem.185.9.1661.

MENG, J.; GONG, M.; BJÖRKBÄCKA, H.; GOLENBOCK, D. T. Genome-wide expression profiling and mutagenesis studies reveal that lipopolysaccharide responsiveness appears to be absolutely dependent on TLR4 and MD-2 expression and is dependent upon intermolecular ionic interactions. **J Immunol**, v. 187, n. 7, p. 3683-3693, 2011. DOI 10.4049/jimmunol.1101397.

METCHNIKOFF, É. **Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation: faites à l'Institut Pasteur en avril et mai 1891**. G. Masson, 1892.

MOAKE, M. M.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 4, n. 1, p. 8-21, 2005. DOI 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00068.x.

MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann Med**, v. 27, n. 3, p. 359-367, 1995. DOI 10.3109/07853899509002589.

MÖLLER, B.; VILLIGER, P. M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF- α in immune-mediated inflammatory diseases. **Springer Semin Immunopathol**, v. 27, n. 4, p. 391-408, 2006. DOI 10.1007/s00281-006-0012-9.

MÖLLER, M.; BOTTI, H.; BATTHYANY, C.; RUBBO, H.; RADI, R.; DENICOLA, A. Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. **J Biol Chem**, v. 280, n. 10, p. 8850-8854, 2005. DOI 10.1074/jbc.M413699200.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J R Soc Med**, v. 92, n. 4, p. 164-169, 1999. DOI 10.1177/014107689909200402.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001. DOI 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.

MORAES-PINTO, M. I.; SUANO-SOUZA, F.; ARANDA, C. S. Immune system: development and acquisition of immunological competence. **J Pediatr (Rio J)**, v. 97 Suppl 1, p. S59-S66, 2021. DOI 10.1016/j.jped.2020.10.006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev**, v. 226, p. 205-218, 2008. DOI 10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x.

MOTSHWENE, P. G.; MONCRIEFFE, M. C.; GROSSMANN, J. G.; KAO, C.; AYALURU, M.; SANDERCOCK, A. M.; ROBINSON, C. V.; LATZ, E.; GAY, N. J. An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. **J Biol Chem**, v. 284, n. 37, p. 25404-25411, 2009. DOI 10.1074/jbc.M109.022392.

MULLER, W. A. Getting leukocytes to the site of inflammation. **Vet Pathol**, v. 50, n. 1, p. 7-22, 2013. DOI 10.1177/0300985812469883.

NAGATA, S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 36, p. 489-517, 2018. DOI 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J**, v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002. DOI 10.1038/nature01320.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 915-918, 1994a. DOI 10.1016/0092-8674(94)90266-6.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 269, n. 19, p. 13725-13728, 1994b.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 3, 2012. DOI 10.1101/cshperspect.a006049.

OH, S. Y.; BOERMANS, H. J.; SWAMY, H. V. L. N.; SHARMA, B. S.; KARROW, N. A. Immunotoxicity of *Penicillium* mycotoxins on viability and proliferation of bovine macrophage cell line (BOMACs). **Open Mycol. J**, v. 6, p. 11-16, 2012.

OH, S. Y.; MEAD, P. J.; SHARMA, B. S.; QUINTON, V. M.; BOERMANS, H. J.; SMITH, T. K.; SWAMY, H. V.; KARROW, N. A. Effect of *Penicillium* mycotoxins on the cytokine gene expression, reactive oxygen species production, and phagocytosis of bovine macrophage (BoMacs) function. **Toxicol In Vitro**, v. 30, n. 1 Pt B, p. 446-453, 2015a. DOI 10.1016/j.tiv.2015.09.017.

OH, S. Y.; QUINTON, V. M.; BOERMANS, H. J.; SWAMY, H. V.; KARROW, N. A. In vitro exposure of *Penicillium* mycotoxins with or without a modified yeast cell wall

extract (mYCW) on bovine macrophages (BoMacs). **Mycotoxin Res**, v. 31, n. 4, p. 167-175, 2015b. DOI 10.1007/s12550-015-0227-5.

OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Wormhole travel for macrophages. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 518-519, 2016. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.005.

ORAY, M.; ABU SAMRA, K.; EBRAHIMIADIB, N.; MEESE, H.; FOSTER, C. S. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opin Drug Saf**, v. 15, n. 4, p. 457-465, 2016. DOI 10.1517/14740338.2016.1140743.

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871-891, 2019. DOI 10.1016/j.immuni.2019.03.020.

OZSOY, N.; SELMANOGLU, G.; KOCKAYA, E. A.; GUL, N.; CEBESoy, S. Effect of patulin on the interdigitating dendritic cells (IDCs) of rat thymus. **Cell Biochem Funct**, v. 26, n. 2, p. 192-196, 2008. DOI 10.1002/cbf.1431.

PANTER, G.; JERALA, R. The ectodomain of the Toll-like receptor 4 prevents constitutive receptor activation. **J Biol Chem**, v. 286, n. 26, p. 23334-23344, 2011. DOI 10.1074/jbc.M110.205419.

PARACELsus, T. Die dritte defension wegen des schreibens der neuen rezepte. **Septem Defensiones**, v. 1538, p. 510, 1965.

PARHAM, P. Putting a face to MHC restriction. **J Immunol**, v. 174, n. 1, p. 3-5, 2005. DOI 10.4049/jimmunol.174.1.3.

PARK, B. S.; LEE, J. O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Exp Mol Med**, v. 45, p. e66, 2013. DOI 10.1038/emm.2013.97.

PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M.; CHOI, B. S.; LEE, H.; LEE, J. O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, 2009. DOI 10.1038/nature07830.

PERCY, M. G.; GRÜNDLING, A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 68, p. 81-100, 2014. DOI 10.1146/annurev-micro-091213-112949.

PERRELLA, M. A.; PATTERSON, C.; TAN, L.; YET, S. F.; HSIEH, C. M.; YOSHIZUMI, M.; LEE, M. E. Suppression of interleukin-1 β -induced nitric-oxide synthase promoter/enhancer activity by transforming growth factor- β 1 in vascular smooth muscle cells. Evidence for mechanisms other than NF- κ B. **J Biol Chem**, v. 271, n. 23, p. 13776-13780, 1996. DOI 10.1074/jbc.271.23.13776.

PERRELLA, M. A.; YOSHIZUMI, M.; FEN, Z.; TSAI, J. C.; HSIEH, C. M.; KOUREMBANAS, S.; LEE, M. E. Transforming growth factor- β 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 β in rat smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 269, n. 20, p. 14595-14600, 1994.

PLÓCIENNIKOWSKA, A.; HROMADA-JUDYCKA, A.; BORZĘCKA, K.; KWIATKOWSKA, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 3, p. 557-581, 2015. DOI 10.1007/s00018-014-1762-5.

POON, I. K.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 3, p. 381-397, 2010. DOI 10.1038/cdd.2009.195.

PUEL, O.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 4, p. 613-631, 2010. DOI 10.3390/toxins2040613.

QU, T.; WANG, E.; JIN, B.; LI, W.; LIU, R.; ZHAO, Z. B. 5-Aminosalicylic acid inhibits inflammatory responses by suppressing JNK and p38 activity in murine macrophages. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 39, n. 1, p. 45-53, 2017. DOI 10.1080/08923973.2016.1274997.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002. DOI 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

RAI, V.; AGRAWAL, D. K. The role of damage- and pathogen-associated molecular patterns in inflammation-mediated vulnerability of atherosclerotic plaques. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 95, n. 10, p. 1245-1253, 2017. DOI 10.1139/cjpp-2016-0664.

RAISTRICK, H. Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier: i. introduction. **Lancet**, v. 242, n. 6273, p. 625, 1943. DOI 10.1016/S0140-6736(00)88176-3.

RAJAEI, A.; BARNETT, R.; CHEADLE, W. G. Pathogen- and danger-associated molecular patterns and the cytokine response in sepsis. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 19, n. 2, p. 107-116, 2018. DOI 10.1089/sur.2017.264.

RAMACHANDRAN, R. A.; LUPFER, C.; ZAKI, H. The inflammasome: regulation of nitric oxide and antimicrobial host defence. **Adv Microb Physiol**, v. 72, p. 65-115, 2018. DOI 10.1016/bs.ampbs.2018.01.004.

RATHINAM, V. A.; VANAJA, S. K.; FITZGERALD, K. A. Regulation of inflammasome signaling. **Nat Immunol**, v. 13, n. 4, p. 333-342, 2012. DOI 10.1038/ni.2237.

RAZIN, A.; CEDAR, H. DNA methylation and gene expression. **Microbiol Rev**, v. 55, n. 3, p. 451-458, 1991.

RE, F.; SIRONI, M.; MUZIO, M.; MATTEUCCI, C.; INTRONA, M.; ORLANDO, S.; PENTON-ROL, G.; DOWER, S. K.; SIMS, J. E.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A. Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function. **J Exp Med**, v. 183, n. 4, p. 1841-1850, 1996. DOI 10.1084/jem.183.4.1841.

RIDER, P.; VORONOV, E.; DINARELLO, C. A.; APTE, R. N.; COHEN, I. Alarmins: feel the stress. **J Immunol**, v. 198, n. 4, p. 1395-1402, 2017. DOI 10.4049/jimmunol.1601342.

RIOS, F. J.; TOUYZ, R. M.; MONTEZANO, A. C. Isolation and Differentiation of Murine Macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 1527, p. 297-309, 2017. DOI 10.1007/978-1-4939-6625-7_23.

RIVAS, F. In this Issue: Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 755,757, 2010.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**, v. 8, n. 1-2, p. 45-49, 1978. DOI 10.1007/BF01972401.

ROCK, K. L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The sterile inflammatory response. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 321-342, 2010. DOI 10.1146/annurev-immunol-030409-101311.

ROMO, M. R.; PEREZ-MARTINEZ, D.; FERRER, C. C. Innate immunity in vertebrates: an overview. **Immunology**, v. 148, n. 2, p. 125-139, 2016. DOI 10.1111/imm.12597.

ROSALLES, C.; URIBE-QUEROL, E. Phagocytosis: a fundamental process in immunity. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 9042851, 2017. DOI 10.1155/2017/9042851.

ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 family cytokines. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 10, n. 2, 2018. DOI 10.1101/cshperspect.a028415.

ROSEN, S. D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 129-156, 2004. DOI 10.1146/annurev.immunol.21.090501.080131.

ROSENTHAL, T. Aulus Cornelius Celsus: his contributions to dermatology. **Archives of Dermatology**, v. 84, n. 4, p. 613-618, 1961.

ROSS, E. A.; DEVITT, A.; JOHNSON, J. R. Macrophages: the good, the bad, and the gluttony. **Front Immunol**, v. 12, p. 708186, 2021. DOI 10.3389/fimmu.2021.708186.

RYU, J. K.; KIM, S. J.; RAH, S. H.; KANG, J. I.; JUNG, H. E.; LEE, D.; LEE, H. K.; LEE, J. O.; PARK, B. S.; YOON, T. Y.; KIM, H. M. Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer. **Immunity**, v. 46, n. 1, p. 38-50, 2017. DOI 10.1016/j.immuni.2016.11.007.

SABIN, F. R. The discrimination of two types of phagocytic cells in the connective tissues by the supravital technique. **Contrib Embryol (Am)**, v. 16, p. 125-162, 1925.

SAGAN, C. **Cosmos**. Nova Iorque: Ballantine Books, 1985. ISBN 978-0345331359.

SALES-NETO, J. M.; LIMA, E. A.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; VASCONCELOS, U.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Anti-inflammatory potential of pyocyanin in

LPS-stimulated murine macrophages. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 41, n. 1, p. 102-108, 2019. DOI 10.1080/08923973.2018.1555845.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cell Mol Life Sci**, v. 53, n. 7, p. 576-582, 1997. DOI 10.1007/s000180050074.

SALVEMINI, D.; KIM, S. F.; MOLLACE, V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 7, p. R473-487, 2013. DOI 10.1152/ajpregu.00355.2012.

SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M. G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 15, p. 7240-7244, 1993. DOI 10.1073/pnas.90.15.7240.

SANCHO, D.; GOMEZ, M.; SANCHEZ-MADRID, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. **Trends Immunol**, v. 26, n. 3, p. 136-140, 2005. DOI 10.1016/j.it.2004.12.006.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 4, p. 2435-2444, 1999. DOI 10.1128/mcb.19.4.2435.

SCHINDLER, H.; BOGDAN, C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 8, p. 1443-1455, 2001. DOI 10.1016/s1567-5769(01)00089-3.

SCOTT, A.; KHAN, K. M.; COOK, J. L.; DURONIO, V. What is "inflammation"? are we ready to move beyond Celsus? **Br J Sports Med**, v. 38, n. 3, p. 248-249, 2004. DOI 10.1136/bjsm.2003.011221.

SEEBOTH, J.; SOLINHAC, R.; OSWALD, I. P.; GUZYLACK-PIRIOU, L. The fungal T-2 toxin alters the activation of primary macrophages induced by TLR-agonists resulting in a decrease of the inflammatory response in the pig. **Vet Res**, v. 43, p. 35, 2012. DOI 10.1186/1297-9716-43-35.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S. A.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J. T.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018. DOI 10.1002/jcp.26429.

SHAW, B. **The doctor's dilemma**. Brentano's, 1911.

SHIRATSUCHI, A.; NAKANISHI, Y. Elimination of influenza virus-infected cells by phagocytosis. **Yakugaku Zasshi**, v. 126, n. 12, p. 1245-1251, 2006. DOI 10.1248/yakushi.126.1245.

SIGMA-ALDRICH®. **Product specification (product number: P1639)**. St. Louis: Sigma-Aldrich®, 2021.

SO, T.; ISHII, N. The TNF-TNFR family of co-signal molecules. **Adv Exp Med Biol**, v. 1189, p. 53-84, 2019. DOI 10.1007/978-981-32-9717-3_3.

SOROKIN, A. Nitric oxide synthase and cyclooxygenase pathways: a complex interplay in cellular signaling. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 24, p. 2559-2578, 2016. DOI 10.2174/0929867323666160729105312.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 217-230, 1999. DOI 10.1016/s0005-2728(99)00016-x.

SUGIYAMA, K.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.; NISHIJIMA, M.; SUGITA-KONISHI, Y. Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. **Toxicol Lett**, v. 192, n. 2, p. 150-154, 2010. DOI 10.1016/j.toxlet.2009.10.020.

SUNDD, P.; POSPIESZALSKA, M. K.; CHEUNG, L. S.; KONSTANTOPOULOS, K.; LEY, K. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology**, v. 48, n. 1, p. 1-35, 2011. DOI 10.3233/BIR-2011-0579.

TAGA, T. The interleukin-6 signal transducer, gp130, functioning in immune, hematopoietic, and neural systems. **Nihon Rinsho**, v. 50, n. 8, p. 1802-1810, 1992.

TAKAHASHI, K. Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concepts. **J Clin Exp Hematop**, v. 41, n. 1, p. 1-31, 2001. DOI 10.3960/jslrt.41.1.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010. DOI 10.1016/j.cell.2010.01.022.

TALMADGE, J. E. Natural product derived immune-regulatory agents. **Int Immunopharmacol**, v. 37, p. 5-15, 2016. DOI 10.1016/j.intimp.2016.02.025.

TAN, J. C.; INDELICATO, S. R.; NARULA, S. K.; ZAVODNY, P. J.; CHOU, C. C. Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. **J Biol Chem**, v. 268, n. 28, p. 21053-21059, 1993.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 10, p. a016295, 2014. DOI 10.1101/cshperspect.a016295.

TENOPOULOU, M.; DOULIAS, P. T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Res**, v. 9, 2020. DOI 10.12688/f1000research.19998.1.

THUCYDIDES; FINLEY, M. I. **History of the peloponnesian war**. Westminster: Penguin Books, 1954. ISBN 978-0140440393.

TOBIAS, P. S.; SOLDAU, K.; GEGNER, J. A.; MINTZ, D.; ULEVITCH, R. J. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with

soluble CD14. **J Biol Chem**, v. 270, n. 18, p. 10482-10488, 1995. DOI 10.1074/jbc.270.18.10482.

TOMMASI, S.; ZHENG, A.; WENINGER, A.; BATES, S. E.; LI, X. A.; WU, X.; HOLLSTEIN, M.; BESARATINIA, A. Mammalian cells acquire epigenetic hallmarks of human cancer during immortalization. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. 1, p. 182-195, 2013. DOI 10.1093/nar/gks1051.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annu Rev Med**, v. 45, p. 491-503, 1994. DOI 10.1146/annurev.med.45.1.491.

TRAVIS, J. Origins. On the origin of the immune system. **Science**, v. 324, n. 5927, p. 580-582, 2009. DOI 10.1126/science.324_580.

TSAI, W. T.; LO, Y. C.; WU, M. S.; LI, C. Y.; KUO, Y. P.; LAI, Y. H.; TSAI, Y.; CHEN, K. C.; CHUANG, T. H.; YAO, C. H.; LEE, J. C.; HSU, L. C.; HSU, J. T.; YU, G. Y. Mycotoxin patulin suppresses innate immune responses by mitochondrial dysfunction and p62/sequestosome-1-dependent mitophagy. **J Biol Chem**, v. 291, n. 37, p. 19299-19311, 2016. DOI 10.1074/jbc.M115.686683.

UNANUE, E. R. Antigen-presenting function of the macrophage. **Annu Rev Immunol**, v. 2, p. 395-428, 1984. DOI 10.1146/annurev.iy.02.040184.002143.

UNANUE, E. R. Perspective on antigen processing and presentation. **Immunol Rev**, v. 185, p. 86-102, 2002. DOI 10.1034/j.1600-065x.2002.18510.x.

USHACH, I.; ZLOTNIK, A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. **J Leukoc Biol**, v. 100, n. 3, p. 481-489, 2016. DOI 10.1189/jlb.3RU0316-144R.

VAN FURTH, R.; COHN, Z.; HIRSCH, J.; HUMPHREY, J.; SPECTOR, W.; LANGEVOORT, H. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull WHO**, v. 46, n. 6, p. 845, 1972.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002. DOI 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

VARELA, M. L.; MOGILDEA, M.; MORENO, I.; LOPES, A. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, 2018. DOI 10.1007/s10753-018-0739-1.

VODOVOTZ, Y.; RUSSELL, D.; XIE, Q. W.; BOGDAN, C.; NATHAN, C. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. **J Immunol**, v. 154, n. 6, p. 2914-2925, 1995.

WAAK, J.; WEBER, S. S.; WALDENMAIER, A.; GORNER, K.; ALUNNI-FABBRONI, M.; SCHELL, H.; VOGT-WEISENHORN, D.; PHAM, T. T.; REUMERS, V.; BAEKELANDT, V.; WURST, W.; KAHLE, P. J. Regulation of astrocyte inflammatory responses by the Parkinson's disease-associated gene DJ-1. **FASEB J**, v. 23, n. 8, p. 2478-2489, 2009. DOI 10.1096/fj.08-125153.

WALSH, J. G.; MURUVE, D. A.; POWER, C. Inflammasomes in the CNS. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 2, p. 84-97, 2014. DOI 10.1038/nrn3638.

WALSH, M. C.; LEE, J.; CHOI, Y. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. **Immunol Rev**, v. 266, n. 1, p. 72-92, 2015. DOI 10.1111/imr.12302.

WEI, H.; LI, B.; SUN, A.; GUO, F. Interleukin-10 family cytokines immunobiology and structure. **Adv Exp Med Biol**, v. 1172, p. 79-96, 2019. DOI 10.1007/978-981-13-9367-9_4.

WEI, Q.; FRENETTE, P. S. Niches for hematopoietic stem cells and their progeny. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 632-648, 2018. DOI 10.1016/j.immuni.2018.03.024.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 427, 2008. DOI 10.1038/454427a.

WESTMAN, J.; GRINSTEIN, S.; MARQUES, P. E. Phagocytosis of necrotic debris at sites of injury and inflammation. **Front Immunol**, v. 10, p. 3030, 2020. DOI 10.3389/fimmu.2019.03030.

WHITE, G. E.; IQBAL, A. J.; GREAVES, D. R. CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 1, p. 47-89, 2013. DOI 10.1124/pr.111.005074.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open Biol**, v. 10, n. 9, p. 200223, 2020. DOI 10.1098/rsob.200223.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, v. 355, n. 9204, p. 646-648, 2000. DOI 10.1016/S0140-6736(99)12031-2.

WINDSOR, W. T.; SYTO, R.; TSARBOPOULOS, A.; ZHANG, R.; DURKIN, J.; BALDWIN, S.; PALIWAL, S.; MUI, P. W.; PRAMANIK, B.; TROTTA, P. P.; ET AL. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. **Biochemistry**, v. 32, n. 34, p. 8807-8815, 1993. DOI 10.1021/bi00085a011.

WITTCHEN, E. S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 14, p. 2522-2545, 2009. DOI 10.2741/3395.

WOLK, K.; KUNZ, S.; ASADULLAH, K.; SABAT, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? **J Immunol**, v. 168, n. 11, p. 5397-5402, 2002. DOI 10.4049/jimmunol.168.11.5397.

WU, H. Higher-order assemblies in a new paradigm of signal transduction. **Cell**, v. 153, n. 2, p. 287-292, 2013. DOI 10.1016/j.cell.2013.03.013.

WYNN, T. A.; RAMALINGAM, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nat Med**, v. 18, n. 7, p. 1028-1040, 2012. DOI 10.1038/nm.2807.

XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **J Leukoc Biol**, v. 56, n. 5, p. 576-582, 1994. DOI 10.1002/jlb.56.5.576.

XIE, Q. W.; CHO, H. J.; CALAYCAY, J.; MUMFORD, R. A.; SWIDEREK, K. M.; LEE, T. D.; DING, A.; TROSO, T.; NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 225-228, 1992. DOI 10.1126/science.1373522.

YANG; HAN, Z.; OPPENHEIM, J. J. Alarmins and immunity. **Immunol Rev**, v. 280, n. 1, p. 41-56, 2017. DOI 10.1111/imr.12577.

YAO, C.; OH, J. H.; LEE, D. H.; BAE, J. S.; JIN, C. L.; PARK, C. H.; CHUNG, J. H. Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes. **Int J Mol Med**, v. 35, n. 5, p. 1443-1450, 2015. DOI 10.3892/ijmm.2015.2146.

YATIM, K. M.; LAKKIS, F. G. A brief journey through the immune system. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 7, p. 1274-1281, 2015. DOI 10.2215/CJN.10031014.

YAZDI, A. S.; GHORESCHI, K. The interleukin-1 family. **Adv Exp Med Biol**, v. 941, p. 21-29, 2016. DOI 10.1007/978-94-024-0921-5_2.

YU, B.; WRIGHT, S. D. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. **J Biol Chem**, v. 271, n. 8, p. 4100-4105, 1996. DOI 10.1074/jbc.271.8.4100.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007. DOI 10.1097/AIA.0b013e318034194e.

ZHAO, Y.; ZOU, W.; DU, J.; ZHAO, Y. The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 10, p. 6425-6439, 2018. DOI 10.1002/jcp.26461.

ZHU, Y.; CHEN, L. Turning the tide of lymphocyte costimulation. **J Immunol**, v. 182, n. 5, p. 2557-2558, 2009. DOI 10.4049/jimmunol.0990006.

APÊNDICE A – CERTIFICADO Nº 105/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
GABINETE DA VICE-REITORIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação de mecanismos celulares e moleculares envolvidos no efeito imunossupressor da patulina**” protocolo nº **105/2016** sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Sandra Rodrigues Mascarenhas** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 16/11/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2021
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss (<i>Mus musculus</i>)
Número de animais	312 animais
Idade/peso	6 – 8 semanas/ 25 - 30 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL

INTITULADO “ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL OF PYOCYANIN IN LPS-STIMULATED MURINE MACROPHAGES”

IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY
https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1555845



ORIGINAL ARTICLE



Anti-inflammatory potential of pyocyanin in LPS-stimulated murine macrophages

José Marreiro de Sales-Neto^a , É. A. Lima^a, L. H. A. Cavalcante-Silva^a, U. Vasconcelos^b and S. Rodrigues-Mascarenhas^a

^aDepartamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^bDepartamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

ABSTRACT

Context: Pyocyanin is a typical *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor, a common Gram-negative rod responsible for a wide range of severe nosocomial infections. There is evidence indicating that pyocyanin has multiple biological activities, but little is known about anti-inflammatory properties.

Objective: This study investigated pyocyanin effect on nitric oxide and cytokine production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine peritoneal macrophages.

Materials and methods: Macrophages were incubated in the presence and absence of pyocyanin (1, 5, 10, 50, and 100 μ M) with and without LPS (1 μ g/mL). Nitric oxide production was determined by Griess reagent and tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β production was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, pyocyanin effects on zymosan A-induced peritonitis in mice were evaluated.

Results: Pyocyanin (5 and 10 μ M) decreased nitric oxide, TNF- α , and IL-1 β production independent of macrophage death. On the other hand, *in vivo*, pyocyanin (5 mg/kg) was not able to affect leukocyte migration into the site of inflammation.

Discussion and conclusion: Thus, our findings suggest that pyocyanin exerts anti-inflammatory effects on murine peritoneal macrophages, downregulating nitric oxide, TNF- α , and IL-1 β levels, which seems to be independent of cell migration. These effects may represent a mechanism of immune evasion; nevertheless more detailed studies should be performed to confirm this hypothesis.

ARTICLE HISTORY

Received 11 August 2018
Revised 23 October 2018
Accepted 2 December 2018

KEYWORDS

Inflammation; natural phenazines; *Pseudomonas aeruginosa*; macrophages; immune response

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a common Gram-negative rod responsible for a wide range of severe nosocomial infections, being often associated with individuals with immunodeficiency diseases, which include burns, human immunodeficiency virus, cystic fibrosis, and patients undergoing cancer chemotherapy [1]. Infections caused by *P. aeruginosa* can affect several body systems, such as central nervous system [2], respiratory tract [3], sensory system [4], urinary tract [5], and vascular system [6]. Throughout infection, *P. aeruginosa* releases several virulence factors that help pathogen, contributing to infection establishment and reestablishment. Some of these virulence factors are pigmented, such as pyoverdine (yellow-green), pyomelanin (brown-reddish), and pyocyanin (greenish-blue) [7,8]. Pyocyanin, also known as 5-methyl-1(5H)-phenazinone, is a redox-active, heterocyclic, nitrogen-containing compound belonging to the class of natural phenazines [9], representing the greater amount phenazine produced by *P. aeruginosa* and one of the more important virulence factor produced by this pathogen [10,11]. Pyocyanin is exclusively synthesized by *P. aeruginosa* from chorismic acid, which is converted by PhzA, PhzB, PhzC, PhzD, PhzE, PhzF, and PhzG enzymes into phenazine-1-

carboxylic acid, and then into phenazine-1-carboxamide, 1-hydroxyphenazine, and 5-methylphenazine-1-carboxylic acid betaine by PhzH, PhzS, and PhzM enzymes, respectively. Next, 5-methylphenazine-1-carboxylic acid betaine is converted by PhzS enzyme into pyocyanin [12], being delivered via type II secretion system [9].

Pyocyanin is a water-soluble zwitterion with a phenol group, which gives it weak acid characteristics (pKa of 4.9). At physiological pH, pyocyanin exists in its neutral form (ionized), which is characterized by blue color. At acid pH values, pyocyanin exists in its charged form (protonated), which is characterized by red color. Zwitterion properties and low molecular weight, about 210.23 g/mol, are believed to promote pyocyanin ability to easily penetrate and interact with cytoplasmic membranes, spreading into local environment [9]. Pyocyanin has been founded in ear secretions (up to 2.7 μ M) [13], sputum (up to 46.8 μ M) [14,15], sputum sol phase (up to 130 μ M) [16], and wounds (up to 8.1 μ M) [17].

Pyocyanin effects on several body systems have been reported [18–24]. Most of these studies is focused on respiratory tract, once *P. aeruginosa* is the main cause of morbidity and early death in patients with cystic fibrosis, being found

CONTACT S. Rodrigues-Mascarenhas sandra@cbiotech.ufpb.br Laboratório de Imunobiotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900, João Pessoa, Brazil.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “C-PHYCOCYANIN TO OVERCOME THE MULTIDRUG RESISTANCE PHENOTYPE IN HUMAN ERYTHROLEUKEMIAS WITH OR WITHOUT INTERACTION WITH ABC TRANSPORTERS”

Biomedicine & Pharmacotherapy 106 (2018) 532–542



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopharm



Original article

C-phycocyanin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters



E. Fernandes e Silva^{a,b,*}, F.S. Figueira^c, A.D. Cañedo^f, K.S. Machado^d, M.T.S.F. Salgado^{a,b},
T.K. Silva^{a,c}, E.F. Wagner^{a,c}, F.H. Mattozo^{a,b}, É.A. Lima^e, J.M. Sales-Neto^e, V.U. Ferreira^f,
A.A. Comitre^{a,c}, S.R. Mascarenhas^e, S.J. Kalil^c, A.P.S. Votto^{a,b}

^a Laboratório de Cultura Celular, ICB, FURG, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, ICB, FURG, RS, Brazil

^c Escola de Química e Alimentos, EQA, FURG, RS, Brazil

^d Centro de Ciências Computacionais, FURG, RS, Brazil

^e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brazil

^f Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Antiproliferative
Docking
ABCB1
ABCC1

ABSTRACT

The phenotype of multidrug resistance (MDR) is one of the main causes of chemotherapy failure. Our study investigated the effect of C-phycocyanin (C-PC) in three human erythroleukemia cell lines with or without the MDR phenotype: K562 (non-MDR; no overexpression of drug efflux proteins), K562-Lucena (MDR; overexpression of ATP-binding cassette, sub-family B/ABCB1), and FEPS (MDR; overexpression of ABCB1 and ATP-binding cassette, sub-family C/ABCC1). Using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, we showed that 20 and 200 µg/mL C-PC decreased K562 viable cells after 24 h and 200 µg/mL C-PC decreased K562-Lucena cell proliferation after 48 h. C-PC did not decrease viable cells of FEPS cells. On the other hand, the MTT assay showed that exposure of 2, 20, and 200 µg/mL C-PC for 24 or 48 h was not cytotoxic to peritoneal macrophages. At 72 h, the trypan blue exclusion assay showed that 20 µg/mL C-PC decreased K562 and K562-Lucena cell proliferation and in FEPS cells, only 200 µg/mL C-PC decreased proliferation. In addition, protein-protein docking showed differences in energy and binding sites of ABCB1 and ABCC1 for C-PC, and these results were confirmed by the efflux protein activity assay. Only ABCC1 activity was altered in the presence of C-PC and FEPS cells showed lower C-PC accumulation, suggesting C-PC extrusion by ABCC1, conferring C-PC resistance. In combination with chemotherapy (vincristine [VCR] and daunorubicin [DNR]), the sensitivity of K562-Lucena cells for C-PC + VCR did not increase, whereas FEPS cell sensitivity for C-PC + DNR was increased. In molecular docking experiments, the estimated free energies of binding for C-PC associated with chemotherapy were similar (VCR: -6.9 kcal/mol and DNR: -7.2 kcal/mol) and these drugs were located within the C-PC cavity. However, C-PC exhibited specificity for tumor cells and K562 cells were more sensitive than K562-Lucena cells, followed by FEPS cells. Thus, C-PC is a possible chemotherapeutic agent for cells with the MDR phenotype, both alone in K562-Lucena cells (resistance due to ABCB1), or in combination with other drugs for cells similar to FEPS (resistance due to ABCC1). Moreover, C-PC did not damage healthy cells (peritoneal macrophages of *Mus musculus*).

1. Introduction

The number of new cases of cancer has increased largely because of growth and aging of the world's population [1]. In 2030, it is expected that cancer will result in approximately 5.76 million deaths worldwide [2,3]. Cancer treatment usually involves chemotherapeutic agents to reduce mortality/morbidity and increase quality of life [4]. However,

several chemotherapeutic agents have a low therapeutic index, generating serious problems, such as a multidrug resistance (MDR) phenotype [5]. The MDR phenotype is the most significant reason for cancer chemotherapeutic failures and plays a central role in cancer metastasis and recovery [6].

MDR is a well known phenomenon that results in the resistance of cancer cells to one chemotherapeutic drug accompanied by resistance

* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália, Km 8, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.
E-mail addresses: star.fs@hotmail.com, fernandesesilvae@furg.br (E. Fernandes e Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.biopharm.2018.06.145>

Received 23 April 2018; Accepted 26 June 2018

0753-3322/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “MORITA-BAYLIS-HILLMAN ADDUCT 2-(3-HYDROXY-2- OXOINDOLIN-3-YL)ACRYLONITRILE (ISACN) MODULATES INFLAMMATORY PROCESS *IN VITRO* AND *IN VIVO*”

Inflammation (© 2020)
DOI: 10.1007/s10753-020-01385-9

ORIGINAL ARTICLE



Morita-Baylis-Hillman Adduct 2-(3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) Modulates Inflammatory Process *In vitro* and *In vivo*

Juliane Santos de França,¹ José Marreiro de Sales-Neto,¹ Deyse Cristina Madruga Carvalho,²
Éssia de Almeida Lima,² Tayná Rodrigues Olegário,³ Rhuan Karlos Santos Mendes,³
Claudio Gabriel Lima-Junior,³ Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos,³ and
Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2,4}

(Received May 29, 2020; accepted November 17, 2020)

Abstract—Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) are synthetic molecules with several biological actions already described in the literature. It has been previously described that adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) has anticancer potential in leukemic cells. Inflammation is often associated with the development and progression of cancer. Therefore, to better understand the effect of ISACN, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory potential of ISACN both *in vitro* and *in vivo*. Results demonstrated that ISACN negatively modulated the production of inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-6 by cultured macrophages. *In vivo*, ISACN 6 and 24 mg/kg treatment promoted reduced leukocyte migration, especially neutrophils, to the peritoneal cavity of zymosan-challenged animals. ISACN displays no anti-edematogenic activity, but it was able to promote a significant reduction in the production of inflammatory cytokines in the peritoneal cavity. These data show, for the first time, that MBHA ISACN negatively modulates several aspects of the inflammatory response, such as cell migration and cytokine production *in vivo* and *in vitro*, thus having an anti-inflammatory potential.

KEY WORDS: MBHA; inflammation; peritonitis; inflammatory process.

INTRODUCTION

MBH adducts represent a novel group of synthetic molecules that display a wide variety of potent biological activities being explored as drug candidates against several diseases [26, 42, 46, 47, 50]. These compounds are obtained from Morita-Baylis-Hillman (MBH) reaction [17, 35] and represent an important tool for development of new molecules [11]. ISACN (2-[3-hydroxy-2-oxoindolin-3-

¹ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, PB 58051-900, Brazil

² Laboratório de Imunobiocologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, PB CEP: 58051-900, Brazil

³ Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, PB, Brazil

⁴ To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Imunobiocologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Joao Pessoa, PB CEP: 58051-900, Brazil. E-mail: sandra@cbiotec.ufpb.br

APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “MUCH MORE THAN A CARDIOTONIC STEROID: MODULATION OF INFLAMMATION BY OUABAIN”



Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain

Luiz H. A. Cavalcante-Silva¹, Éssia de Almeida Lima², Deyse C. M. Carvalho³, José M. de Sales-Neto¹, Anne K. de Abreu Alves², José G. F. M. Galvão¹, Juliane S. de França da Silva¹ and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Immunobiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Immunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ³ Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Immunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
Carlos Rosales,
Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Reviewed by:
Bruno Vogt,
University of Bern, Switzerland
Timothy J. Moss,
Ritchie Centre, Australia

***Correspondence:**
Sandra Rodrigues-Mascarenhas
sandra@cbiotec.ufpb.br

Specialty section:
This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 06 September 2017

Accepted: 24 October 2017

Published: 10 November 2017

Citation:
Cavalcante-Silva LHA, Lima ÉA, Carvalho DCM, Sales-Neto JM, Alves AKA, Galvão JGFM, Silva JSF and Rodrigues-Mascarenhas S (2017) Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain. *Front. Physiol.* 8:895. doi: 10.3389/fphys.2017.00895

Since the discovery of ouabain as a cardiotonic steroid hormone present in higher mammals, research about it has progressed rapidly and several of its physiological and pharmacological effects have been described. Ouabain can behave as a stress hormone and adrenal cortex is its main source. Direct effects of ouabain are originated due to the binding to its receptor, the Na⁺/K⁺-ATPase, on target cells. This interaction can promote Na⁺ transport blockade or even activation of signaling transduction pathways (e.g., EGFR/Src-Ras-ERK pathway activation), independent of ion transport. Besides the well-known effect of ouabain on the cardiovascular system and blood pressure control, compelling evidence indicates that ouabain regulates a number of immune functions. Inflammation is a tightly coordinated immunological function that is also affected by ouabain. Indeed, this hormone can modulate many inflammatory events such as cell migration, vascular permeability, and cytokine production. Moreover, ouabain also interferes on neuroinflammation. However, it is not clear how ouabain controls these events. In this brief review, we summarize the updates of ouabain effect on several aspects of peripheral and central inflammation, bringing new insights into ouabain functions on the immune system.

Keywords: ouabain, immune system, peripheral inflammation, cell migration, cytokines, neuroinflammation

INTRODUCTION

Although the cardiotonic steroid ouabain was originally identified as a plant secondary metabolite (e.g., from *Strophantus gratus* and *Acokanthera ouabaio*), it was later described as an endogenous mammalian substance (Hamlyn et al., 1991) such as other cardiotonic steroids (e.g., marinobufagenin and digoxin) (Bagrov et al., 2009). Ouabain was found in bovine adrenal gland (Laredo et al., 1994; Schneider et al., 1998), adrenal gland tumors (Blanco and Wallace, 2013), bovine hypothalamus (Tymiak et al., 1993), bovine hypophysis (Schoner, 2002), and human plasma (Hamlyn et al., 1991; Ferrandi et al., 1997). It is noteworthy that ouabain isolated from mammalian tissues and body fluids is structurally, biochemically, and immunologically indistinguishable to ouabain isolated from plants (Schoner, 2002).

APÊNDICE F – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “NEUTROPHILS AND COVID-19: THE ROAD SO FAR”

International Immunopharmacology 90 (2021) 107233



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



Review

Neutrophils and COVID-19: The road so far

Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva, Deyse Cristina Madruga Carvalho, Éssia de Almeida Lima, José G.F.M. Galvão, Juliane S. de França da Silva, José Marreiro de Sales-Neto, Sandra Rodrigues-Mascarenhas*

Laboratório de Imunobiocologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Inflammation
Chemokines
NETs
SARS-CoV2

ABSTRACT

The SARS-CoV2 infection triggers a multisystem inflammatory disorder, known as COVID-19, a pandemic disease. This disease is characterized by acute respiratory distress syndrome, cytokine-driven hyperinflammation, and leukocytes count changes. The innate immune response has been linked to COVID-19 immunopathogenesis (e.g., dysfunctional IFN response and myeloid inflammation). In this regard, neutrophils have been highlighted as essential effector cells in the development of COVID-19. This review summarized the significant finds about neutrophils and its effector mechanisms (e.g., neutrophil enzymes and cytokines, neutrophil extracellular traps) in COVID-19 so far.

1. Introduction: COVID-19

COVID-19 (Coronavirus disease 2019) is an infectious inflammatory disease caused by SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) [1], a new type of coronavirus identified in China in December 2019 after several patients were diagnosed with nonspecific pneumonia [2]. The coronavirus outbreak began in Wuhan, the capital of Hubei province, and quickly spread across continental dimensions, turning Covid-19 into a pandemic disease [3].

Coronaviruses are single-stranded RNA viruses that are characterized by having corona-like projections on their surface. There are four main proteins in the structure of these microorganisms, including the spike protein (S), which is related to the host cell mechanism of invasion [4]. The SARS-CoV-2 is the third virus of the β coronavirus group to demonstrate the capacity to infect humans with pandemic potential [5]. SARS-CoV and the MERS-CoV (Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus) were responsible for previous relevant outbreaks of respiratory disease in 2003 [6,7] and 2012 [8,9], respectively.

Human-to-human transmission occurs through direct contact or respiratory droplets from infected individuals, whether symptomatic or asymptomatic [10–12]. Several reports have suggested that other forms of transmission, such as the fecal-oral route [13–16] and intrauterine vertical transmission, may also happen [17,18]. However, more studies need to be carried out to confirm this form of transmission.

The clinical features of COVID-19 may appear after an incubation

period of around 5–14 days [19]. Some early symptoms resemble those of other viral respiratory infections, such as those caused by influenza viruses. However, dyspnea and high fever define the main clinical difference between COVID-19 and common cold [20]. Additionally, when compared to the influenza virus, SARS-CoV-2 infection presents greater chances of progressing to severe and critical infections, which require oxygen therapy and ventilatory support [21]. Elderly patients and those with chronic conditions have higher risks of rapid progression to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multiple organ failure, often resulting in death. These features demonstrate a systemic aspect of this infection, which is accompanied by an intense inflammatory process [22–24].

2. COVID-19 and inflammation

The COVID-19 infection starts by exposure to microdroplets present in the exhalations of infected individuals. Then, the SARS-CoV-2 spreads to the bronchioles and alveolar spaces [25], entrancing into the host cells (e.g., endothelial, epithelial, and smooth muscle cells) by binding the angiotensin-converting enzyme (ACE)-2, a metalloproteinase present on the cell surface [26–29].

In the lung, SARS-CoV-2 infects the alveolar cells (type I and II pneumocytes and alveolar macrophages) and then starts intracellular replication in pulmonary tissues. Type I and III interferons (IFN) production is an early defense mechanism in the alveolar cells [25].

* Corresponding author.

E-mail address: sandra@cbiotec.ufpb.br (S. Rodrigues-Mascarenhas).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107233>

Received 17 September 2020; Received in revised form 13 November 2020; Accepted 22 November 2020

Available online 30 November 2020

1567-5769/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE G – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA INTERNACIONAL INTITULADO “PATULIN INHIBITS LPS-INDUCED NITRIC OXIDE PRODUCTION BY SUPPRESSING MAPKS SIGNALING PATHWAY”

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2021516>



SHORT COMMUNICATION



Patulin inhibits LPS-induced nitric oxide production by suppressing MAPKs signaling pathway

José Marreiro de Sales-Neto^a , Juliane Santos de França da Silva^a ,
Deyse Cristina Madruga Carvalho^a , Éssia de Almeida Lima^a ,
Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva^a , Aline Portantiolo Lettnin^b , Ana
Paula de Souza Votto^b , Ulrich Vasconcelos^c and Sandra Rodrigues-
Mascarenhas^a

^aLaboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil; ^bLaboratory of Cell Culture, Biological Sciences Institute, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil; ^cLaboratory of Environmental Microbiology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

ABSTRACT

Patulin (PAT) is a natural product isolated from several species of fungi. Here, we evaluated the effect of PAT (62.5–4,000 ng/ml) in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine peritoneal macrophages. Cell viability assay showed that PAT at concentrations up to 250 ng/ml did not affect macrophage viability. PAT (250 ng/ml) significantly reduced LPS-induced nitric oxide production (by 98.4%), inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression (by 83.5%), and iNOS messenger ribonucleic acid expression (by 100.0%). Moreover, PAT significantly reduced LPS-induced interleukin-1 β (by 80.6%), cluster of differentiation (CD) 69 (by 63.1%), and Toll-like receptor (TLR) 4 (by 91.9%) protein expression. Finally, PAT significantly reduced LPS-triggered phosphorylation of all mitogen-activated protein kinases (MAPK) assessed: extracellular signal-regulated kinase (ERK; by 89.5%), c-Jun N-terminal kinase (JNK; by 77.5%), and p38 (by 72.3%). Taken together, these data suggest that PAT downregulates acute inflammatory response, inhibiting nitric oxide production by suppressing CD69-TLR4/ERK-JNK-p38 MAPKs/Nos2/iNOS signaling pathway.

ARTICLE HISTORY

Received 1 September 2021
Accepted 11 December 2021

KEYWORDS

4-hydroxy-4H-furo(3,2-C)-
pyran-2(6H)-one; clavacin;
macrophage; acute
inflammation

CONTACT Sandra Rodrigues-Mascarenhas sandra@cbiotec.ufpb.br

Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2021516>.

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

APÊNDICE H – CAPÍTULO DE LIVRO INTITULADO “PACIENTE DIABÉTICO: UM CUIDADO MULTIPROFISSIONAL”

José Izak Ribeiro de Araújo

*Farmacêutico pela Universidade Federal da Paraíba
Mestre e doutor pela Universidade Federal de Pernambuco*

José Marreiro de Sales Neto

*Engenheiro de Biotecnologia e Bioprocessos pela Universidade Federal de Campina Grande
Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba*

Josefa Wllian Araújo Severo

*Enfermeira pelas Faculdades Integradas de Patos
Especialista em Saúde da Família pelas Faculdades Integradas de Patos
Mestrado Profissional em Terapia Intensiva pelo Instituto Multidisciplinar Brasileiro de Educação em Saúde*

Juliane Santos de França da Silva

*Farmacêutica pela Universidade Federal da Paraíba
Mestra e doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba*

Kácia Kayronne Duarte da Silva

*Psicóloga pela Faculdade Santa Maria, Cajazeiras PB
Especialista em Saúde Mental pela Faculdade Integrada do Ceará
Especialista em Intervenção ABA para Autismo e Deficiência Intelectual – CBI of Miami, AVM e Universidade Cândido Mendes, Rio de Janeiro RJ.*

Kamilla Pires de Almeida

*Psicóloga pela Faculdade Santa Maria, Cajazeiras PB
Especialista em Saúde Mental pela Faculdade Integrada do Ceará
Coaching em emagrecimento e avaliação para cirurgia bariátrica pelo Centro de Estudos em Terapia Cognitiva Comportamental de São Paulo
Capacitada para reconhecimento, diagnóstico e avaliação do TEA pelo CBIofMiami*

Leyla Helenna Gouveia Ribeiro

*Nutricionista pela Universidade Federal de Campina Grande.
Especialista em Nutrição Clínica: metabolismo, prática e terapia nutricional e em Nutrição com ênfase em Obesidade e Emagrecimento*

Lucas Medeiros Camilo

Profissional de Educação Física (licenciatura), pelo Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia da Paraíba

Maria Diane Praxedes Barbosa

*Nutricionista pela Faculdade Santa Maria, Cajazeiras PB
Especialista em Nutrição Oncológica pelo DNA Cursos e Graduações, João Pessoa, PB
Especialista em Saúde Mental e Gerontologia pela Faculdade de Ciências da Bahia
Especialista em Docência do Ensino Superior pela Faculdade Santa Maria, Cajazeiras, PB*

Marleny Andrade Abreu

*Enfermeira pela Universidade Federal de Campina Grande
Especialista em Urgência, Emergência e Unidade de Terapia Intensiva e em Segurança do Trabalho pela Faculdade Santa Maria, Cajazeiras PB*

Nathália Alexandra de Oliveira Cartaxo Furtado

*Farmacêutica pela Universidade Estadual da Paraíba
Especialista em Farmacologia Clínica pela Unifip
Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual da Paraíba
Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco
Professora lato sensu da especialização em Farmácia Clínica e Prescrição Farmacêutica na Unifip*

APÊNDICE I – CAPÍTULO DE LIVRO INTITULADO “PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS”

PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

José Marreiro de Sales-Neto^a
Sandra Rodrigues-Mascarenhas^b

INTRODUÇÃO AO TEMA

Organismos microscópicos (p. ex., bactérias, vírus, fungos e protozoários) são constantemente inalados e ingeridos, além de habitarem a nossa pele e as nossas mucosas. Alguns microrganismos patogênicos podem penetrar no organismo humano e causar doenças infecciosas. Em contrapartida, possuímos órgãos (p. ex., baço, linfonodos, medula óssea e timo), células (p. ex., basófilos, células assassinas naturais, células dendríticas, eosinófilos, linfócitos, mastócitos, monócitos/macrófagos e neutrófilos) e moléculas (p. ex., alarminas, anticorpos, catelicidinas, citocinas, defensinas, proteínas da fase aguda e proteínas do sistema complemento), que, em conjunto, são responsáveis pela proteção do organismo humano contra doenças, reconhecendo e eliminando microrganismos invasores por meio de uma resposta coletiva e organizada, chamada resposta imunológica. Os órgãos, células e moléculas responsáveis por essa proteção formam o sistema imunológico.¹

A inflamação é uma resposta imunológica dos tecidos vascularizados estimulada por diversos fatores, os mais comuns são as infecções e as lesões (p. ex., queimaduras, traumas, entre outras). Como resultado, células e moléculas do sistema imunológico são recrutadas do sangue para o tecido afetado, onde liberam vários mediadores inflamatórios (p. ex., citocinas, eicosanoides e quimiocinas). Após a eliminação do estímulo, a resposta inflamatória é encerrada e a restauração do tecido lesionado é iniciada. Embora normalmente seja capaz de restaurar a integridade perdida, a inflamação desregulada pode se tornar uma doença (p. ex., artrite reumatoide, asma, aterosclerose, doença

a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, BR (Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). engenheiro.sales@gmail.com.

b Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, BR (Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). sandra@cbiotec.ufpb.br.

**APÊNDICE J – ORGANIZAÇÃO DE LIVRO INTITULADO “AQUI SE FAZ
CIÊNCIA! PESQUISAS DESENVOLVIDAS EM UNIVERSIDADES FEDERAIS E
SUAS APLICABILIDADES PARA A SOCIEDADE”**

Equipe organizadora

Aleson Pereira de Sousa
Ana Laura de Cabral Sobreira
Danilo Duarte de Assis Gadelha
Diana Pontes da Silva
Edeltrudes de Oliveira Lima
Edvaldo Balbino Alves Júnior
Francielly Negreiros de Araújo
Francisco Patricio de Andrade Júnior
Giulian César da Silva Sá
Helivaldo Diógenes da Silva Souza
José Marreiro de Sales-Neto
Laísa Vilar Cordeiro
Larissa Rodrigues Bernardo
Pedro Thiago Ramalho de Figueiredo
Sarah de Sousa Ferreira
Vanessa de Melo Cavalcanti Dantas
Vanessa Morais Muniz

APÊNDICE K – PATENTE INTITULADA “OUABAÍNA COMO INIBIDOR DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS”

Nome: JOSÉ MARREIRO DE SALES NETO

CPF: 08346824432

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: : Rua Creusa Campos de Vasconcelos, nº 303, Apto. 103,
Mangabeira

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58057-370

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 550526

Fax:

Email: engenheiro.sales@gmail.com

Inventor 6 de 7

Nome: DEYSE CRISTINA MADRUGA CARVALHO

CPF: 09126085445

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Estudante Manoel Soares de Lima Filho, nº 29, Apto. 202,
Jardim São Paulo

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-005

País: BRASIL

Telefone: (83) 988 489601

Fax:

Email: deysecmc@gmail.com

Inventor 7 de 7

APÊNDICE L – PATENTE INTITULADA “PATULINA PARA TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO”

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 9

Nome: SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS

CPF: 05334211799

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Glaube Leite do Egito Reekers, nº 168

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58102-337

País: BRASIL

Telefone: (83) 991 427083

Fax:

Email: sandra@cbiotec.ufpb.br

Inventor 2 de 9

Nome: JOSÉ MARREIRO DE SALES NETO

CPF: 08346824432

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: : Rua Creusa Campos de Vasconcelos, nº 303, Apto. 103, Mangabeira

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58057-370

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 550526

Fax:

Email: engenheiro.sales@gmail.com

Inventor 3 de 9

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 04/08/2022 às 12:23, Petição 870220069213

APÊNDICE M – PATENTE INTITULADA “UTILIZAÇÃO DO ADUTO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN DERIVADO DA ISATINA ISACN PARA O TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO”

Nome: LUIZ HENRIQUE AGRA CAVALCANTE SILVA

CPF: 07433991450

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Alzira Coutinho de Araújo, Nº 65, Residencial Souza Fernandes, Apto. 104, Bancários.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-119

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 722525

Fax:

Email: luiz0710@gmail.com

Inventor 6 de 10

Nome: JOSÉ MARREIRO DE SALES NETO

CPF: 08346824432

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Creusa Campos de Vasconcelos, Nº 303, Apto. 103, Mangabeira.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58057-370

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 550526

Fax:

Email: engenheiro.sales@gmail.com

Inventor 7 de 10

**APÊNDICE N – RESUMO APRESENTADO EM EVENTO CIENTÍFICO
INTERNACIONAL INTITULADO “ROLE OF C-PHYCOCYANIN FROM *SPIRULINA
PLATENSIS* ON HUMAN ERYTHROLEUKEMIC CELLS RESISTANT TO
MULTIPLE DRUGS”**

Role of c-phycoerythrin from *Spirulina platensis* on human erythroleukemic cells
resistant to multiple drugs

Silva, E.F. #1,2#, #Wagner, E.F. ##1,3#, Figueira, F.S. #3#, Lopes, A.C.#1,3#, Sales
Neto, J.M.#4#, Lima, É.A.,#4#, Kalil, S.J.#3#,
#Mascarenhas, S.R. #4#, Votto, A.P.S.#1,2#

#1#Laboratório de Cultura Celular, ICB, FURG, RS, Brasil.

#2#Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, ICB, FURG, RS, Brasil.

#3#Escola de Química e Alimentos, EQA, FURG, RS, Brasil.

#4# Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brasil.

Introduction and objectives

The C-phycoerythrin (C-PC), a phycobiliprotein extracted from cyanobacteria *Spirulina platensis*, generates cytotoxicity and/or inhibition of proliferation in several tumor cell lines. The multidrug resistance (MDR) phenotype represents one of the major challenges to the success of chemotherapy and the role of C-PC on MDR cells remains poorly explored. The aim of this study was to determine the anti-MDR role of C-PC on human erythroleukemia cell lines: K562 (sensitive, parental), Lucena 1 (vincristine - VCR resistant) and FEPS (daunorubicin - DNR resistant), as well as to verify the specificity of C-PC to tumor cells by cytotoxicity in *Swiss* murine peritoneal macrophages (healthy cells).

Material and Method

The tumoral cells were obtained from the Tumoral Immunology Laboratory (Rio de Janeiro Federal University). The K562 cells were grown in RPMI 1640 with fetal bovine serum, antibiotic/antimycotic at 37 °C. Lucena 1 and FEPS were grown under the same conditions plus VCR (60 nM) and DNR (532 nM). Cytotoxicity (24/48h) on tumor cells (2×10^4) and peritoneal macrophages (4×10^5 /ethics committee: 111/2016) was evaluated with 0; 2; 20; 200 µg/ml of C-PC by MTT assay. It was made concentration-response curves from 0 to 96 h for tumor cells (2×10^4) with 0; 2; 20; 50; 100; 200 µg/ml of C-PC by Trypan Blue. Apoptosis/necrosis for tumoral cells (100; 200 µg/ml of C-PC, 72h) was determined by epifluorescence microscopy with acridine orange/ethidium bromide. It was used analysis of variance/Tukey post-test and $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results and conclusion

By the MTT analysis for K562 cell line it is verified that the concentrations of 20 and 200 µg/ml of C-PC were cytotoxic from 24 h, whereas for the Lucena 1 the effects are perceived only in the concentration of 200 µg/ml ml at 48h. For FEPS cell line was not significant difference. C-PC demonstrated specificity for tumor cells since MTT analysis in peritoneal macrophages did not demonstrate cytotoxicity independently of concentration or time of analysis. The concentration-response curves demonstrated the ability of C-PC to inhibit cell proliferation. For the K562 and Lucena 1 cell lines, this inhibition is observed with 20µg/ml at 72h and for FEPS, in this same experimental time only the concentration of 200 µg/ml is capable of inhibiting proliferation. The results of apoptosis/necrosis demonstrate that C-PC does not generate cell death by necrosis and the generation of apoptosis is significant only for K562. Finally, C-PC has specificity for tumor cells and the K562 were more sensitive than Lucena 1, followed by FEPS.