UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MARCELLA NICOLINI FURTADO

**Contribuição do CD14 na ativação e produção de prostanoídes por
macrófagos**

Ribeirão Preto – SP

2018

MARCELLA NICOLINI FURTADO

**Contribuição do CD14 na ativação e produção de prostanoídes por
macrófagos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção
do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Ribeirão Preto - SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Furtado, Marcella Nicolini

Contribuição do CD14 na ativação e produção de prostanoídes por macrófagos. Ribeirão Preto, 2018.
89 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. CD14. 2. LPS. 3. Macrófagos. 4. MDMO. 5. Prostanóides

Nome: FURTADO, Marcella Nicolini

Título: Contribuição do CD14 na ativação e produção de prostanoídes por macrófagos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção
do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), Universidade de São Paulo. Essa dissertação foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) (Processo: 134195/2016-7); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) (Processo: #2014/07125-6); Equipamentos Multiusuários (EMU) (Processo FAPESP: 2015/00658-1).

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Antônio Adelino Pina Furtado** e **Valderez Nicolini Furtado**, por todo incentivo e apoio incondicional. Amo muito vocês!

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela oportunidade de ingressar na pós-graduação e pela confiança. Agradeço pelo incentivo diário e por acreditar no meu potencial, sempre me impulsionando a dar o melhor de mim. Minha eterna gratidão!

Agradeço aos professores membros da banca examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos colaboradores Camila Oliveira, Ana Paula Peti, Carlos Sorgi e Luiz Gustavo Gardinassi, muito obrigada por toda a ajuda e suporte nos experimentos e análises dos resultados.

Aos meus queridos colegas do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) e LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), Alyne, Carol, Carlos, Luana, Rayanne, Polyane, Jefferson, Edson, Ana, Camila, Luiz Gustavo, Mouzarllem, Morgana, Fabi, Felipe, Patrick e Ricardo por todo apoio e companhia diária.

À técnica do laboratório em citometria de fluxo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Fabiana Rosseto de Moraes, pela aquisição dos dados de citometria.

Agradeço imensamente aos meus amigos, em especial Edson Junior, Ricardo Castro, Jefferson Elias, Murillo Duarte, Patrick Fernandes, Polyane Lima e Priscilla Tartari por todos os momentos que compartilhamos juntos dentro e fora do laboratório. Vocês são irmãos que a pós-graduação me deu. Sentirei muitas saudades! Estarão sempre em meu coração!

Aos meus pais, Valdez e Toninho, por serem grandes exemplos e espelhos na minha vida e por estarem sempre ao meu lado. Muito obrigada por investirem em mim e acreditarem nos meus sonhos. Amo muito vocês!

Aos funcionários dos biotérios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio técnico na manutenção dos animais.

À secretária do programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, pela disponibilidade e auxílio.

Ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, que foi essencial e de fundamental importância para a minha formação pessoal e profissional.

Ao CNPq (Processo nº 134195/2016-7) e à FAPESP (Processo: #2014/07125-6) pelo apoio financeiro que foi indispensável para a realização deste trabalho.

Obrigada!

*“Uma pessoa humilde é aquela
que não diminui o outro para crescer”*

Mario Sergio Cortella

Resumo

RESUMO

FURTADO, M. N. **Contribuição do CD14 na ativação e produção de prostanoídes por macrófagos**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A molécula CD14 é uma glicoproteína expressa na membrana de leucócitos e células não mielóides, e pode ser encontrada tanto na membrana plasmática ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI), como na forma solúvel no espaço extracelular. Esta molécula atua como co-receptor associado a receptores semelhantes a Toll (TLR), dentre eles o TLR4, e auxilia na ativação celular após reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Macrófagos ativados por produtos microbianos, como pelo lipopolissacarídeo (LPS), liberam citocinas e óxido nítrico (NO) que participam do processo inflamatório e sinalizam para células vizinhas ou distantes sobre a presença de agente agressor ou alterações teciduais. Após a ativação dos macrófagos, também são produzidos eicosanóides (EICs) que são mediadores lipídicos, como as prostaglandinas (PGs), os tromboxanos (TXs) e os leucotrienos (LTs). Os EICs são derivados em parte dos corpúsculos lipídicos (CLs) que são organelas citoplasmáticas funcionais, dinâmicas, ricas em lipídios e enzimas. Resultados anteriores do nosso grupo já demonstraram o envolvimento da molécula CD14 na produção de mediadores lipídicos, sem, contudo, elucidar os mecanismos. Assim, empregando macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) estimulados com alta (500 ng/mL) e baixa (10 ng/mL) concentrações de LPS, tivemos como objetivo investigar a participação do CD14 na formação de CLs e na produção de prostanoídes. A relevância da molécula CD14 foi ainda investigada na ativação de MDMO pelo ácido araquidônico exógeno (AA) (estímulo não específico). Nossos resultados demonstraram que a molécula CD14 contribui não somente para a formação de CLs e produção de prostanoídes, como PGE₂ e TXB₂, mas também é essencial para a síntese de mediadores inflamatórios, como NO, TNF- α e IL-10, principalmente quando estimulados com baixa concentração de LPS.

Palavras-chave: CD14; Citocinas; LPS; Macrófago; MDMO; Prostanoídes.

Abstract

ABSTRACT

FURTADO, M. N. **Contribution of CD14 in cell activation and production of prostanoids**. 2018. 89 p. Dissertation (Master Degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The CD14 molecule is a membrane-bound glycoprotein expressed by leukocytes and non-myeloid cells, which can be attached to the plasma membrane by glycosylphosphatidylinositol (GPI) or in its soluble form in the extracellular space. This molecule acts as a co-receptor associated with Toll-like receptors (TLRs), including TLR4, and assists in cell activation after recognition of molecular patterns associated with pathogens (PAMPs). Macrophages activated by microbial products, such as lipopolysaccharide (LPS), release cytokines and nitric oxide (NO) that participate in the inflammatory process and signal to nearby or distant cells about the presence of an aggressive agent or tissue changes. After activation of macrophages, the lipid mediators denominated eicosanoids, such as prostaglandins (PGs), thromboxanes (TXs) and leukotrienes (LTs) are also produced. Eicosanoids are derived in part from lipid droplets (LDs) which are functional, dynamic cytoplasmic organelles, rich in lipids and enzymes. Previous results from our group have already demonstrated the involvement of the CD14 molecule in the production of lipid mediators, without, however, elucidating the mechanisms. Thus, using bone marrow-derived macrophages (BMDM) stimulated with high (500 ng/mL) and low (10 ng/mL) LPS concentrations, we aimed to investigate the participation of CD14 in the formation of LDs and in the production of prostanoids. The relevance of the CD14 molecule was further investigated by the activation of BMDM by exogenous arachidonic acid (AA) (nonspecific stimulus). Our results demonstrated that the CD14 molecule contributes not only to the formation of CLs and the production of prostanoids, such as PGE₂ and TXB₂, but it is also essential for the synthesis of inflammatory mediators, such as NO, TNF- α and IL-10, especially when stimulated with low LPS concentration.

Keywords: BMDM; CD14; Cytokines; LPS; Macrophages; Prostanoids.

Lista de figuras

Figura 1: MDMO expressam mais CD14 do que células precursoras da medula óssea.....	48
Figura 2: Curva concentração-resposta de estimulação com LPS para produção de NO por MDMO	49
Figura 3: Dependência de CD14 e TLR4 para a produção de NO, TNF- α e IL-10 por MDMO estimulados com alta ou baixa concentração de LPS	51
Figura 4: CD14 e TLR4 regulam a expressão dos genes <i>Ptgs2</i> e <i>Ptges2</i> , em MDMO estimulados com alta concentração de LPS.....	53
Figura 5: A formação de CLs em MDMO estimulados com LPS é reduzida em células deficientes de CD14 ou TLR4.....	55
Figura 6: CD14 e TLR4 regulam a produção de prostanoídes por MDMO pré-estimulados com LPS e tratados com ionóforo de cálcio.....	57
Figura 7: AA induz formação de CLs em MDMO independente das moléculas CD14 e TLR4	59
Figura 8: Produção de EICs por MDMO de animais C57BL/6, CD14 ^{-/-} e TLR4 ^{-/-} é influenciada por tratamento de longo tempo com AA seguido de pré-estimulação com LPS..	61
Figura 9: LPS ou AA não induzem morte de MDMO.....	62

Lista de abreviaturas

15-LO:	15 lipoxigenase
5-LO:	5 lipoxigenase
AA:	Ácido araquidônico
AMPC:	Monofosfato cíclico de adenosina
AP-1:	Proteína ativadora 1
BLT1:	Receptor de alta afinidade para LTB ₄
BLT2:	Receptor de baixa afinidade para LTB ₄
CaCl₂:	Cloridrato de cálcio
CL:	Corpúsculo lipídico
COX:	Cicloxigenase
COX-1:	Cicloxigenase 1
COX-2:	Cicloxigenase 2
cPLA₂α:	Fosfolipase A2α citosólica
DAMP:	Padrão molecular associado a danos
EIC:	Eicosanoide
EP1:	Receptor de prostaglandina E ₂ 1
EP2:	Receptor de prostaglandina E ₂ 2
EP3:	Receptor de prostaglandina E ₂ 3
EP4:	Receptor de prostaglandina E ₂ 4
Fizz1:	<i>Found in inflammatory zone-1</i>
FLAP:	Proteína ativadora de 5-LO
GM-CSF:	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
H₂SO₄:	Ácido sulfúrico
HBSS:	Solução salina balanceada de Hanks
HCl:	Ácido clorídrico
<i>H. capsulatum:</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>
IFN-γ:	Interferon-gama
IL-1:	Interleucina 1
IL-10:	Interleucina 10
IL-12:	Interleucina 12
IL-13:	Interleucina 13
IL-1α:	Interleucina 1 alfa
IL-1β:	Interleucina 1 beta

IL-3:	Interleucina 3
IL-4:	Interleucina 4
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzível
IRF3:	Fator de resposta ao Interferon 3
LBP:	Proteína sérica de ligação ao LPS
LPS:	Lipopolissacarídeo
LT:	Leucotrieno
LTB₄:	Leucotrieno B ₄
LTC₄:	Leucotrieno C ₄
LTD₄:	Leucotrieno D ₄
LTE₄:	Leucotrieno E ₄
M1:	Macrófago M1
M2:	Macrófago M2
MAPK:	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
mCD14:	CD14 de membrana
M-CSF:	Fator estimulador de colônias de monócitos
MDMO:	Macrófago derivado de medula óssea
MgCl:	Cloridrato de magnésio
MTT:	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<i>M. tuberculosis:</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MyD88:	Molécula adaptadora de diferenciação mieloide 88
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NFAT:	Fator nuclear de células T ativadas
NF-κB:	Fator nuclear kappa B
NO:	Óxido nítrico
NO₂⁻:	Nitrito
NOS:	Óxido nítrico sintase
OPD:	o-phenylenediamine dihydrochloride
OsO₄:	Tetróxido de ósmio
PAMP:	Padrão molecular associado a patógenos
PG:	Prostaglandina
PGD₂:	Prostaglandina D ₂

PGE₂:	Prostaglandina E ₂
PGE-S:	Prostaglandina E sintase
PGF_{2α}:	Prostaglandina PGF _{2α}
PGI₂:	Prostaciclina
PLA₂:	Fosfolipase A ₂
PRR:	Receptor de reconhecimento de padrões
Ptgds:	PGD ₂ sintase
Ptges2:	PGE ₂ sintase
Ptgs2:	COX-2, isoforma induzida
ROS:	Espécies reativas de oxigênio
sCD14:	CD14 solúvel
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
TGF-β:	Fator de transformação do crescimento beta
TLR:	Receptor semelhante a Toll
TLR1:	Receptor semelhante a Toll 1
TLR2:	Receptor semelhante a Toll 2
TLR3:	Receptor semelhante a Toll 3
TLR4:	Receptor semelhante a Toll 4
TLR5:	Receptor semelhante a Toll 5
TLR6:	Receptor semelhante a Toll 6
TLR7:	Receptor semelhante a Toll 7
TLR9:	Receptor semelhante a Toll 9
TMB:	Tetrametilbenzidina
TNF-α:	Fator de necrose tumoral alfa
TP:	Receptor para tromboxano-prostanoide
TRAM:	Proteína da cadeia de translocação associada à membrana
TRIF:	Adaptador indutor de interferon-β contendo domínio TIR
TsV:	Peçanha bruta de escorpião <i>Tityus serrulatus</i>
TX:	Tromboxano
TXA₂:	Tromboxano A ₂
TXB₂:	Tromboxano B ₂
VAMP:	Padrão molecular associado a venenos

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Macrófagos: origem, desenvolvimento e funções	22
1.2	Macrófagos e receptores da imunidade inata	24
1.3	Ativação e produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos	26
1.4	Ativação, produção de mediadores lipídicos e formação de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Animais	38
4.2	Eutanásia e retirada dos ossos fêmur e tíbia.....	38
4.3	Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea	38
4.4	Avaliação dos marcadores de MDMO por citometria de fluxo	39
4.5	Estimulação dos MDMO <i>in vitro</i>	40
4.6	Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	40
4.7	Quantificação de óxido nítrico	41
4.8	Quantificação de mediadores lipídicos	41
4.9	Coloração e contagem dos corpúsculos lipídicos.....	43
4.10	Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR.....	44
4.11	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio	45
4.12	Análise Estatística.....	45
5	RESULTADOS.....	47
5.1	A expressão de CD14 aumenta significativamente em MDMO	47
5.2	Determinação das concentrações de LPS para ativação de MDMO	49
5.3	As moléculas CD14 e TLR4 medeiam a produção de NO, TNF- α e IL-10 por MDMO estimulados com alta ou baixa concentrações de LPS	50
5.4	CD14 é necessário para induzir a expressão dos genes <i>Ptgs2</i> e <i>Ptges2</i> por MDMO estimulados com LPS	52
5.5	A formação de CLs em MDMO estimulados com LPS é regulada pelas moléculas CD14 e TLR4.....	54
5.6	CD14 regula a produção de TXB ₂ e PGE ₂ por MDMO estimulados com LPS.....	56
5.7	Avaliação da formação de CLs em MDMO na presença de AA, o qual não é ligante de CD14 e TLR4.	58
5.8	O estímulo com AA por longo período e concomitante ou não com LPS, modula a produção de mediadores lipídicos.	60
5.9	AA exógeno não induz morte celular de MDMO estimulados com LPS	62
6	DISCUSSÃO.....	64
7	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXOS	89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Macrófagos: origem, desenvolvimento e funções

Os macrófagos são células importantes nas respostas imune inata e adquirida, os quais desempenham função de sentinela e são responsáveis pelo reconhecimento, fagocitose e morte de uma variedade de patógenos (FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016). Quando reconhecem os patógenos ou são estimulados por produtos microbianos, liberam diversos mediadores inflamatórios e, por isto, são reconhecidos como células do processo inflamatório (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). Estas células foram descritas no século dezanove por Elie Metchnikoff, e suas funções efetoras de defesa do hospedeiro contra infecções, manutenção e reparo tecidual são consideradas elementos centrais da resposta imune (CAVAILLON, 2011). Estes fagócitos podem ser originados a partir de três diferentes fontes: saco vitelínico, fígado fetal e medula óssea (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014; GINHOUX; JUNG, 2014).

Durante o período embrionário, os macrófagos são produzidos primeiramente pelo saco vitelínico do embrião por um processo conhecido como hematopoiese “primitiva” (MCGRATH; PALIS, 2005). No decorrer do desenvolvimento do feto, ocorre diminuição da produção pelo saco vitelínico, e o fígado torna-se o responsável por esta produção (PALIS, YODER, 2001). Após o nascimento, a medula óssea passa a ser o sítio hematopoiético definitivo da produção dos precursores destas células (HALDAR; MURPHY, 2014; LAVIN et al., 2015; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). Na medula óssea, as células mieloides precursoras são estimuladas por citocinas hematopoiéticas, como as interleucinas 3 (IL-3) e 6 (IL-6), pelo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF), originando os monócitos (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). Quando maduros, os monócitos saem da medula e mantêm-se presentes na circulação sanguínea, constituindo a maior população de leucócitos do sangue periférico, e migram para os tecidos nos processos inflamatório e/ou infeccioso dependendo do microambiente e das citocinas inflamatórias ali presentes, onde são capazes de se diferenciar em macrófagos inflamatórios ou em células dendríticas (GEISSMANN et al., 2010; GUILLIAMS et al., 2014; JAKUBZICK; RANDOLPH; HENSON, 2017). Esses monócitos são classificados em 3 tipos: clássicos, intermediários e não clássicos. Os monócitos clássicos são os primeiros a serem recrutados durante a resposta inflamatória e participam principalmente do reconhecimento e da eliminação de micro-organismos. Os intermediários também possuem atividades pró-

inflamatórias, mas são recrutados tardiamente em relação ao primeiro, atuando especialmente como célula apresentadora de antígeno, além de estarem associados com a secreção de citocinas pró-inflamatórias e serem importantes para o reparo tecidual (BOYETTE et al., 2017; SPRANGERS; DE VRIES; EVERTS, 2016; WONG et al., 2012). Os monócitos não clássicos, por sua vez, possuem papel fundamental como patrulheiros, pois são vigilantes do endotélio vascular, tanto em condições homeostáticas quanto inflamatórias, removendo células danificadas e detritos celulares (AUFRAY et al., 2007; THOMAS et al., 2015). Nos tecidos, os macrófagos inflamatórios podem ainda apresentar diferentes características fenotípicas e funcionais de acordo com o estímulo de ativação. Macrófagos ativados pela via clássica por citocinas como Interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), lipopolissacarídeo (LPS) e $\text{TNF-}\alpha$, são conhecidos como M1, que são fundamentais para o combate a patógenos e células cancerígenas. Se ativados pela via alternativa, por citocinas como IL-4 e IL-13, diferenciam-se em M2, que são responsáveis, principalmente, pela resolução da inflamação, limpeza e reparo tecidual (MARTINEZ; GORDON, 2014; SAQIB et al., 2018).

Todos os tecidos do corpo humano possuem macrófagos residentes originados principalmente de fontes embrionárias, ou seja, do saco vitelínico e/ou do fígado fetal (HALDAR; MURPHY, 2014; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). Estes macrófagos estão arranjados de forma estratégica nos tecidos, sendo responsáveis pela proteção dos mesmos contra lesões e infecções e, por isso, são considerados células vigilantes do sistema imunológico (FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015). Estas células se distribuem em populações heterogêneas com diferentes características e especialidades conforme o microambiente em que residem, recebendo diferentes nomenclaturas: osteoclastos (nos ossos), micróglia (no sistema nervoso), células de Kupffer (no fígado) e macrófagos alveolares (nos pulmões) (DAVIES et al., 2013). As células de Kupffer atuam na proteção do fígado e regeneração deste órgão em caso de lesão (DIXON et al., 2013); os macrófagos alveolares agem contra patógenos do trato respiratório (HUSSELL; BELL, 2014); os osteoclastos são grandes responsáveis pela reabsorção da matriz e remodelamento do tecido ósseo (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003); a micróglia possui ação protetora no sistema nervoso central e grande importância na manutenção dos neurônios (WAKE; MOORHOUSE; NABEKURA, 2011). Outras células residentes essenciais são os macrófagos intestinais, envolvidos na preservação e reparo de mucosas, bem como na homeostase da microbiota (BAIN; MOWAT, 2014).

1.2 Macrófagos e receptores da imunidade inata

Dentre os mecanismos efetores dos macrófagos, destaca-se a fagocitose, processo pelo qual há o englobamento de micro-organismos, para posterior digestão/destruição dos mesmos. Células, células mortas e tumorais também são fagocitadas e eliminadas por macrófagos (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017). A fagocitose é desencadeada após o reconhecimento do patógeno ou células alteradas por receptores da membrana celular ou intracitoplasmáticos conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões moleculares (do inglês, PRRs), levando a ativação dos macrófagos, liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (ADEREM, 2003; ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014)(MEDZHITOV, 2008). A inflamação é um evento essencial da resposta imune, principalmente na resposta imune inata, no qual os macrófagos estão envolvidos. Trata-se de um processo fisiológico iniciado por diversos fatores, como infecções, traumas e lesões teciduais. Uma vez induzida, uma sequência de eventos celulares e moleculares é desencadeada em busca da resolução da inflamação e volta ao estado de homeostase (MEDZHITOV, 2008). Os principais indutores da inflamação podem ter origem endógena, como os padrões moleculares associados a danos (do inglês, DAMPs), ou exógena, como os padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, PAMPs) (MEDZHITOV, 2008), e padrões moleculares associados a venenos (do inglês, VAMPs) (ZOCCAL et al., 2014). Esses indutores, tais como LPS derivados de bactérias Gram-negativas (PARK; LEE, 2013), beta-glucana derivada de fungos (HERRE; GORDON; BROWN, 2004; SORGI et al., 2017), toxinas derivadas de peçonhas (ZOCCAL et al., 2014), antígenos derivados de parasitas e alérgenos (RAES et al., 2005), por exemplo, são reconhecidos pelos PRRs. Dentre os PRRs, a família de receptores semelhantes a Toll (do inglês, TLRs) é a mais bem estudada. Estes receptores reconhecem moléculas de natureza diversa, como lipopeptídeos (por heterodímeros de TLR1:TLR2 e TLR1:TLR6), peptidoglicanos (pelo TLR2), LPS (por TLR4), flagelina (por TLR5) (MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011; O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013) e peçonhas (por TLR2 e TLR4) (ZOCCAL et al., 2014), entre outros. A sinalização intracelular desencadeada após interação entre PAMPs e TLRs é mediada por proteínas adaptadoras, como a molécula adaptadora de diferenciação mieloide 88 (MyD88), além do adaptador indutor de Interferon- β contendo domínio TIR (TRIF), proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP) e proteína da cadeia de translocação associada à membrana (TRAM). O acionamento da cascata de sinalização culmina na ativação fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora 1 (AP-1), os quais controlam a expressão de diversos genes

(MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011; O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013), como os *Il1b*, *Il10*, *Ptges*, *Ptgs2*, *Tnfa* e *Nos2*, por exemplo (YANG; WU; WANG, 2016).

1.2.1 O receptor CD14

A molécula CD14 é uma glicoproteína que pode ser encontrada ligada à membrana celular por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 55-kDa (mCD14) (HAZIOT et al., 1988; SIMMONS et al., 1989), ou presente em fluídos biológicos na forma solúvel (sCD14) (BAZIL et al., 1986). Apesar de ser um marcador clássico de monócitos (ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010), também está presente na membrana dos demais leucócitos, e expresso por células de linhagem não mieloides (JERSMANN, 2005). Por estar envolvida no reconhecimento de estruturas de micro-organismos como o LPS, e participar da resposta imune inata, o CD14 também é considerado um PRR (PUGIN et al., 1994; WRIGHT, 1995).

A associação entre CD14 e TLRs já é conhecida, sendo que o CD14 foi inicialmente descrito por seu papel no reconhecimento de LPS (HAILMAN et al., 1994; WRIGHT et al., 1990), atuando como um co-receptor de TLR4, e indutor de sinalização intracelular (CHOW et al., 1999; POLTORAK et al., 1998). Contudo, o CD14 pode auxiliar na ativação celular mediada por outros TLRs, como TLR1 e TLR2 (ELASS et al., 2005; MANUKYAN MARIA et al., 2005; RABY et al., 2013), TLR3 (LEE et al., 2006) e até mesmo TLR7 e TLR9 (BAUMANN et al., 2010). Atualmente é sabido que, na resposta inflamatória induzida por bactérias Gram-negativas ou pelo próprio LPS, além do TLR4 há necessidade da participação de outras três moléculas acessórias, a proteína sérica de ligação do LPS (LBP), o CD14 e a proteína acessória MD-2 (GIOANNINI; WEISS, 2007; MIYAKE, 2007). A LBP captura e transfere o LPS para o CD14, que com auxílio da MD-2 o transfere para o TLR4, (GIOANNINI et al., 2005; PARK; LEE, 2013). Quando ativado, o TLR4 sinaliza por vias dependentes de TIRAP-MyD88 e TRAM-TRIF, culminando na ativação do NF- κ B ou do fator de resposta ao Interferon 3 (IRF3), respectivamente (AKIRA; HOSHINO, 2003), sendo que esta última ocorre no endossoma após internalização do complexo CD14-TLR4-MD-2 (ZANONI et al., 2011). No entanto, a ativação celular via TLR4 pode acontecer de maneira dependente ou independente da molécula CD14. Em baixas concentrações de LPS, o TLR4 precisa ser auxiliado pelo CD14 para ser capaz de ativar as células e desencadear a resposta inflamatória. No entanto, em altas concentrações, o LPS é reconhecido pelo TLR4 independente do CD14, e este PRR sozinho é capaz de ativar as células (HE et al., 2016; PERERA et al., 1997). Além da sinalização via TLR4, já foi demonstrado que o CD14 é capaz de sinalizar de maneira autônoma via fator nuclear de células T ativadas (NFAT)

(ZANONI; GRANUCCI, 2013). Contudo, ainda não se sabe como a ativação dessa via de sinalização é iniciada pelo CD14.

Os monócitos e macrófagos, uma vez ativados liberam o sCD14 (SHIVE et al., 2015). Esta molécula em sua forma solúvel é encontrada em grande quantidade na circulação de indivíduos com sepse (BURGMANN et al., 1996; YAEHASHI et al., 2005), naqueles com inflamações alérgicas (KUSUNOKI et al., 1998) ou em indivíduos envenenados por escorpião (ZOCCAL et al., 2018). Sua inibição protege o organismo contra danos e necrose (SCHIMKE et al., 1998), uma vez que anticorpos anti-CD14 diminuem a liberação de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo LPS (LETURCQ et al., 1996; SCHIMKE et al., 1998). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa também mostraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos pode ser regulada por CD14 (ZOCCAL et al., 2014, 2018). Macrófagos competentes estimulados *in vitro* com a peçonha bruta do escorpião *Tityus serrulatus* (TsV) produzem altas concentrações de mediadores inflamatórios como IL-6, TNF- α e Prostaglandina (PG) E₂ (PGE₂), e baixas concentrações de Leucotrieno (LT) B₄ (LTB₄). Contudo, macrófagos deficientes da molécula CD14, estimulados nas mesmas condições, produzem baixas concentrações das citocinas citadas acima, além de apresentarem aumento na síntese de LTB₄ e diminuição de PGE₂, quando comparado com os macrófagos competentes (ZOCCAL et al., 2014). Também *in vivo*, foi demonstrado que essa molécula é necessária para a produção de PGE₂, monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e IL-1 β , que medeiam a inflamação e a morte de animais envenenados por TsV (ZOCCAL et al., 2018).

Outros pesquisadores também demonstraram a importância do CD14 para a regulação da produção de TNF- α (BORZECKA et al., 2013; HE et al., 2016; PERERA et al., 1997) de óxido nítrico (NO) (MOON; PYO, 2000; SAITO et al., 2000), de PGE₂, e para a regulação da expressão de *Ptges-1* em resposta ao LPS (ZANONI et al., 2012), ou ao TsV (ZOCCAL et al., 2018). Além disso, CD14 parece reprimir a produção de LTB₄ (ZOCCAL et al., 2014, 2018). Estes dados indicam que a contribuição do receptor CD14 para ativação da cicloxigenase 2 (COX-2), inibição da 5-lipoxigenase (5-LO) e, consequentemente, para a produção de mediadores lipídicos, precisa ser melhor investigada.

1.3 Ativação e produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos

Como mencionado acima, uma vez estimulados via PRRs, os macrófagos fagocitam e matam o agente agressor, pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (decorrente da ativação do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase - NADPH), produção de NO (pela ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível – iNOS), citocinas,

mediadores lipídicos, moléculas Fizz1 (do inglês, *found in inflammatory zone-1*) e Ym1 (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; NONNENMACHER; HILLER, 2018); (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2013).

A IL-1 é uma citocina que foi originalmente descrita por induzir febre (HUISING et al., 2004). Esta citocina ocorre em duas formas, IL-1 α e IL-1 β (MARCH et al., 1985), que têm efeitos autócrinos e sistêmicos (DINARELLO, 1996; LONNEMANN et al., 1995). A IL-1 β pode ser produzida por macrófagos ativados, sendo considerada um marcador da inflamação aguda, já que sua ação pró-inflamatória é crucial para a defesa do hospedeiro contra patógenos (DINARELLO, 1996; MAYER-BARBER et al., 2014).

A IL-6 é uma citocina pleitrópica da resposta imune, participa da inflamação e, da hematopoiese em cooperação com a IL-3 (KISHIMOTO; AKIRA; TAGA, 1992). Diversos tipos de células, dentre elas monócitos e macrófagos estimulados com LPS, IL-1 ou TNF- α , produzem esta citocina (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). A IL-6 tem efeito dual, pois não somente está envolvida nas respostas inflamatórias e infecciosas, mas também apresenta propriedades anti-inflamatórias e regenerativas (SCHELLER et al., 2011).

O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória produzida pelos macrófagos em diferentes patologias e nas infecções, sendo que produtos microbianos como o LPS, estão entre os seus principais indutores (HOAREAU et al., 2010; VAN DER BRUGGEN et al., 1999). Tem importante papel nos mecanismos de defesa nas infecções bacterianas, virais e parasitárias (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010), regula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-8 e IL-6 (MAINI et al., 1995), e é capaz de inibir a atividade de enzimas relacionadas com o metabolismo de lipídios (BEIER; VÖLKL; FAHIMI, 1992; PRICE; OLIVECRONA; PEKALA, 1986), induzir lipólise (MATTACKS; POND, 1999; ZHANG et al., 2002) e regular o metabolismo do colesterol (MEMON et al., 1993).

A IL-10, por sua vez, apresenta efeitos anti-inflamatórios e imuno-reguladores, pois regula a produção de TNF- α , levando à resolução da inflamação e ao controle da resposta imune. (D'ANDREA et al., 1993; DE WAAL MALEFYT et al., 1991). A produção da IL-10 por macrófagos pode ser estimulada por diferentes patógenos como *Burkholderia pseudomallei* (KESSLER et al., 2017), *Leishmania donovani* (GHALIB et al., 1993), *Candida albicans* (ROMANI et al., 1994), *Mycobacterium tuberculosis* (HIGGINS et al., 2009), bem como pelo LPS (CHANTEUX et al., 2007). Os macrófagos produzem ainda outras citocinas, como fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), IL-8 e IL-12, as quais contribuem para a indução ou regulação das respostas imune e inflamatória (ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; CAVAILLON, 1994; TURNER et al., 2014).

O NO é um radical livre inorgânico solúvel sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por meio de reações químicas catalisadas pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MARLETTA, 1993; MONCADA; HIGGS, 1993). Os macrófagos são as principais células do sistema imune que produzem NO após um estímulo inflamatório. Este mediador desempenha papel fundamental na inflamação, sendo responsável pela vasodilatação. Além disso, pode atuar diretamente como um radical livre ou ainda interagir com o radical superóxido, por exemplo, levando à formação de ROS, cujas reações citotóxicas resultam na destruição de patógenos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; NATHAN; HIBBS, 1991).

1.4 Ativação, produção de mediadores lipídicos e formação de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos

Os mediadores lipídicos, como PGs, Tromboxanos (TXs) e LTs, são eicosanoides (EICs) derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) participam da resposta inflamatória, podem regular a resposta imune e a ativação do inflamassoma (MACHADO et al., 2005, 2010; MEDEIROS et al., 2004; PERES et al., 2007; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; SECATTO et al., 2012, 2014; ZOCCAL et al., 2016, 2018). O AA é um ácido graxo poli-insaturado formado por 20 carbonos que contém quatro dupla ligações (MARTIN; BRASH; MURPHY, 2016). Ele está presente tanto de forma esterificada nos fosfolipídios de membranas celulares, como também pode ser encontrado nos corpúsculos lipídicos (CLs) presentes nas células mieloides (WELLER, 2016). Além disso, tecidos como cérebro, fígado, baço e músculo esquelético possuem AA em abundância (TALLIMA; HADLEY; EL RIDI, 2015). Esta molécula é obtida pela dieta, através da ingestão de alimentos como carnes, peixes, aves e ovos (KOMPRDA et al., 2005; LI et al., 1998; TABER; CHIU; WHELAN, 1998). O AA auxilia na fluidez da membrana celular, conferindo uma maior flexibilidade e motilidade da mesma, o que influencia na função de proteínas de membrana envolvidas na sinalização celular (BRASH, 2001). Quando livre, o AA também é muito importante para a modulação da função de canais iônicos e de diversos receptores e enzimas (TALLIMA; EL RIDI, 2018). Quando o AA é oxidado por diferentes oxigenases, diversos lipídios com diferentes atividades biológicas, como os EICs, podem ser formados (BRASH, 2001; FITZPATRICK; SOBERMAN, 2001; HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008).

O AA pode ser liberado da membrana celular através de hidrólise catalisada pela fosfolipase A₂ (PLA₂) (LESLIE, 2004; LEWIS; AUSTEN, 1984). Uma vez liberado, o AA pode sofrer a ação de enzimas como 5-LO, COX, que são responsáveis pela síntese de LTs e de prostanoídes (PGs e TXs), respectivamente (FUNK, 2001).

Existem duas isoformas da enzima COX, a COX-1 expressa de forma constitutiva nas células e que participa da homeostasia (BOTTING, 2006; DUBOIS et al., 1998; O'NEILL; FORD-HUTCHINSON, 1993), e a COX-2 cuja expressão é induzida por estímulos inflamatórios (O'BANION et al., 1991; SIROIS; RICHARDS, 1992). A indução da COX-2 pode ainda ocorrer pela ação de mediadores inflamatórios, como TNF- α (DIAZ et al., 1998), IL-1 β (MOLINA-HOLGADO et al., 2000), ou ainda por LPS (LEE et al., 2001). De maneira oposta, a expressão de COX-2 pode ser diminuída por citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13 (ONOE et al., 1996; SCOTT; BRYANT; BIDGOOD, 1999). As PGs, derivadas das COX-1 e COX-2, são a PGE₂, a prostaglandina D₂ (PGD₂), a prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}), e a Prostaciclina (PGI₂), (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). A PGE₂ participa da inflamação induzindo vasodilatação e aumento a permeabilidade vascular (OMORI et al., 2014). Também, inibi a fagocitose via indução de AMPc (ARONOFF; CANETTI; PETERS-GOLDEN, 2004), suprimi a morte de patógenos devido à inibição do complexo NADPH oxidase (SEREZANI et al., 2007), e inibe a ativação de neutrófilos (TALPAIN et al., 1995). Esta PG é a mais abundante do organismo (SERHAN; HAMBERG; SAMUELSSON, 1984), e exerce suas ações via 4 receptores (EP1, EP2, EP3 e EP4) presentes nas membranas celulares, especialmente nas de macrófagos (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). A PGD₂ é liberada por macrófagos (SORGI et al., 2017) e mastócitos, sendo aumentada em processos alérgicos, onde medeia a broncoconstrição e a vasodilatação, além de inibir a agregação plaquetária (ALVING; MATRAN; LUNDBERG, 1991; ELLIS; WEI; KONTOS, 1979). Além disso, a PGD₂ também tem efeitos anti-inflamatórios pois inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (JIANG; TING; SEED, 1998; KIYOMIYA; OH-ISHI, 1985). As funções efetoras desencadeadas por esta PG, por sua vez, são mediadas por dois receptores de alta afinidade, sendo eles conhecidos como receptores prostanoídes 1 e 2 (DP1 e DP2) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Recentemente, foi demonstrado que a PGD₂ e PGE₂ desempenham papéis opostos na ativação de macrófagos alveolares infectados com *Histoplasma capsulatum*, sendo que a PGD₂ ativa e a PGE₂ inibe suas funções efetoras (PEREIRA et al., 2018).

Os TXs são derivados principalmente da via da COX-1. O tromboxano A₂ (TXA₂) é um metabólito muito instável e hidrolisado rapidamente em sua forma estável e biologicamente inativa, o tromboxano B₂ (TXB₂) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). O TXA₂, apesar de ser conhecido pelas suas ações pró-coagulantes e vasoconstritoras, também desempenha importante papel na resposta imune, sendo suas ações mediadas por um único receptor, o TP (THOMAS et al., 2003).

O LTB₄ e os cisteinil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) são EICs capazes de ativar o endotélio vascular, recrutar leucócitos para o local da inflamação, estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (DI GENNARO; HAEGGSTRÖM, 2014; MEDEIROS et al., 2004), aumentar a fagocitose e a morte de micro-organismos como *M. tuberculosis* (PERES et al., 2007a), *H. capsulatum* (SECATTO et al., 2014), *Streptococcus pyogenes* (SOARES et al., 2013), bem como de partículas fúngicas como o zymosan (OKAMOTO et al., 2010). O LTB₄ se liga em dois diferentes receptores acoplados à proteína G, o BLT1 (receptor de alta afinidade) e o BLT2 (receptor de baixa afinidade) (YOKOMIZO, 2015). Apesar de apresentar atividade pró-inflamatória em diferentes modelos, recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que este mediador também possui atividade anti-inflamatória, por ser um potente inibidor da produção de AMPc e assim regular a ativação do inflamassoma induzido pelo TsV (ZOCCAL et al., 2016). Também demostramos que LTB₄ é essencial para o controle da infecção com *Achromobacter xylosoxidans* via produção de α -defensina-1 nos pulmões (PRADO et al., 2017).

Apesar de muitas vezes possuírem diferentes papéis em contextos distintos, os EICs estão intimamente correlacionados com as citocinas. Sabe-se que a PGE₂ é capaz de inibir a produção de TNF- α , mas aumentar a liberação de IL-10 (TREFFKORN et al., 2004). A inibição de TNF- α pela PGE₂ ocorre de maneira dose-dependente, inclusive quando em baixas concentrações. Entretanto, em altas concentrações, a PGE₂ inibe a produção de IL-10 (RENTZ et al., 1988). Por outro lado, a produção de PGE₂ pode ser induzida pelo TNF- α (NAKAO et al., 2002) e regulada pela IL-10 (NIHO et al., 1998). Além de ser induzida por PGE₂ e TNF- α , a IL-10 também é capaz de regular negativamente a produção desses mediadores (NIHO et al., 1998). Outras evidências envolvendo inibidores da via da 5-LO, bloqueando de forma parcial ou total a produção de TNF- α já foram descritas na literatura, como também já foi demonstrado que a adição exógena de LTB₄ restaura a produção desta citocina (DUBOIS; BISSONNETTE; ROLA-PLESZCZYNSKI, 1989). No entanto, dados conflitantes estão descritos na literatura, como aquele demonstrando que a inibição da via da 5-LO pelo MK-886 não afeta a produção de TNF- α (HOFFMAN et al., 1991). Porém, dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que camundongos infectados com *H. capsulatum* e tratados com MK-886 além de apresentarem diminuição na produção de LTB₄, LTC₄ e NO, tiveram aumento na produção de TNF- α (MEDEIROS et al., 2004).

1.4.1 Corpúsculos lipídicos

Além de citocinas e outros mediadores, os CLs também são considerados marcadores da inflamação (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007). Estes corpúsculos são organelas ricas em lipídios, normalmente presentes em pequeno número no citoplasma de diversos tipos celulares, incluindo as células do sistema imune (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009). Em casos de infecções, neoplasias ou inflamação há o aumento desses corpúsculos citoplasmáticos (BOZZA; VIOLA, 2010). A sua formação é específica e depende de estímulo, fato que também varia quanto ao tipo celular e aos receptores pelos quais as células são ativadas (BANDEIRA-MELO; PHOOFOLLO; WELLER, 2001; BOZZA et al., 1996, 1998). Estas organelas são originadas do desdobramento do retículo endoplasmático para o citoplasma, possuem uma região central lipídica e hidrofóbica, na qual estão presentes alguns lipídios neutros como diacilglicerol, triglicerídeos e ésteres de esteróis, além de proteínas (BOZZA; MAGALHÃES; WELLER, 2009; MARTIN; PARTON, 2006; TAUCHI-SATO et al., 2002). Devido ao seu conteúdo, os CLs possuem papel importante na regulação do metabolismo de lipídios, na sinalização celular e na síntese de mediadores inflamatórios (BOZZA; VIOLA, 2010). Por apresentarem grandes quantidades de AA, e enzimas como a fosfolipase A₂α citosólica (cPLA₂α), a 5-LO, a 15-lipoxigenase (15-LO), as COX-1 e COX-2, a prostaglandina E sintase (PGE-S) e a proteína ativadora de 5-LO (FLAP), são considerados também sítios de produção de mediadores lipídicos (BOZZA et al., 2011). Neste contexto, Pacheco e colaboradores (2002) demonstraram que nos CLs induzidos por LPS, as enzimas 5-LO e COX-2 estão co-localizadas nos mesmos e associadas ao aumento da produção de LTs e PGs *in vivo*. Outros autores também mostram associação entre o aumento da síntese de PGE₂ e a formação de CLs induzidos pelo *Mycobacterium bovis* (D'AVILA et al., 2006), ou por *Trypanosoma cruzi* (DE ALMEIDA et al., 2018; MELO et al., 2003). A co-localização da 5-LO em CLs, bem como o aumento da capacidade de produção de LTB₄, foi ainda demonstrada em macrófagos estimulados por leptina e na infecção por *H. capsulatum* (MAYA-MONTEIRO et al., 2008; SORGI et al., 2009). Estes resultados indicam que os EICs, além de serem derivados dos fosfolipídios da membrana celular, também podem se originar do metabolismo lipídico dos CLs (CHAP, 2016).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

CD14 é uma molécula fundamental para o reconhecimento de PAMPs, entre elas o LPS, para desencadear a ativação de macrófagos e a resposta inflamatória. Na membrana celular, esta molécula pode estar isolada ou associada com outros receptores, como o TLR4. Dessa forma, o CD14 contribui para a sinalização intracelular responsável pela produção dos mediadores solúveis. No entanto, evidências experimentais têm demonstrado que o CD14 também pode sinalizar independente de outras moléculas, e mediar *per se* o processo inflamatório. Neste contexto, o CD14 após ligar ao LPS, pode induzir a síntese de mediadores lipídicos e citocinas inflamatórias, além de ser importante para a produção de NO. Contudo, a contribuição desta molécula na formação dos CLs, ativação da COX-2 e na liberação de prostanoídes precisa ser melhor investigada. Entender o papel do CD14 no metabolismo lipídico pode ser fundamental para desvendar os mecanismos que participam da resposta inflamatória nas infecções por bactérias Gram-negativas.

Objetivo

3 OBJETIVO

Investigar a contribuição do CD14 na produção de prostanoídes e na formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) estimulados com baixa ou alta concentrações de LPS.

3.1 Objetivos específicos

Empregando MDMO estimulados com baixa (10 ng/mL) ou alta (500 ng/mL) concentrações de LPS, avaliamos:

- 3.1.1 A participação da molécula CD14 na produção de EICs;
- 3.1.2 A participação da molécula CD14 na formação de CLs;
- 3.1.3 A importância do CD14 para a expressão de genes de enzimas do metabolismo dos EICs;
- 3.1.4 A participação da molécula CD14 na produção de TNF- α , IL-10 e NO;
- 3.1.5 A relevância do CD14 na ativação de MDMO por estímulo não específico (AA).

Observação: Como o CD14 é um co-receptor do TLR4, a contribuição deste receptor foi investigada para comparação e controle. Assim determinamos em sobrenadante de MDMO TLR4^{-/-} estimulados com LPS, a produção de TNF- α , IL-10 e NO, bem como de EICs. Além disso, avaliamos formação CLs nestas células.

3.2 Estratégias para alcançar nosso objetivo

- 3.2.1 Diferenciação de precursores em macrófagos derivados da medula óssea (MDMO);
- 3.2.2 Avaliação dos marcadores de MDMO por citometria de fluxo;
- 3.2.3 Estimulação dos MDMO *in vitro* com baixa (10 ng/mL) ou alta (500 ng/mL) concentrações de LPS;
- 3.2.4 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- 3.2.5 Quantificação de óxido nítrico;
- 3.2.6 Quantificação de mediadores lipídicos;
- 3.2.7 Coloração e contagem de corpúsculos lipídicos;
- 3.2.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (RT-PCR) para avaliação da expressão dos genes que codificam as enzimas do metabolismo de prostanoídes;

- 3.2.9 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia de Parasitoses (LIIP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP – Campus Ribeirão Preto).

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos com peso entre 18-20 g, machos ou fêmeas, das linhagens C57BL/6 (selvagem), CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) no dia 15/12/2016 (Protocolo número 16.1.782.60.0).

4.2 Eutanásia e retirada dos ossos fêmur e tíbia

Para a obtenção das células da medula óssea, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com a combinação das drogas cloridrato de quetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e fixados em uma prancha cirúrgica. A assepsia da pele foi feita com álcool 70% seguida da eutanásia através de exsanguinação por punção cardíaca. Posteriormente, através de um corte cutâneo no abdômen, a pele do animal foi retirada totalmente até os membros pélvicos. Os músculos dos membros pélvicos foram removidos até a exposição dos ossos fêmur e tíbia. Estes foram retirados cuidadosamente, limpos de tendões e músculos e reservados em tubos de 2 mL contendo meio de cultura RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA) incompleto (em gelo) até o momento da extração das células da medula óssea.

4.3 Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea

MDMO foram utilizados para os experimentos *in vitro*. Para obtenção das células precursoras de MA, as epífises dos ossos fêmur e tíbia foram removidas e a medula óssea foi removida com RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA) incompleto com auxílio de seringa com agulha 4,5 x 13 mm 26G em ambiente estéril. As células recém-colhidas foram suspensas e cultivadas em 10 mL de meio RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco,

Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA), 30% do sobrenadante de cultura de células L929, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MI, EUA) (RPMI 20/30) (MARIM et al., 2010). As células foram diferenciadas em placas de Petri para cultura celular (90 x 15mm) e incubadas em estufa à 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. No quarto dia, foram adicionados mais 10 mL de RPMI 20/30 nas placas e estas foram incubadas por mais 3 dias. Para a obtenção dos MDMO, o sobrenadante da cultura foi descartado e foram adicionados às células 6 mL de PBS 1x estéril. As placas foram incubadas à 4°C por 25 minutos. Em seguida, os MDMO foram gentilmente coletados da placa com o auxílio de uma pipeta sorológica e transferidos para um tubo cônico de 50 mL. As células foram centrifugadas a 400 g, 4°C durante 10 minutos e suspensas em RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA), 5% do sobrenadante de cultura de células L929, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MI, EUA) (RPMI 10/5).

4.4 Avaliação dos marcadores de MDMO por citometria de fluxo

A expressão dos marcadores de superfícies F4/80 e CD11b foi avaliada em MDMO, para confirmação do fenótipo de diferenciação das células precursoras da medula óssea em macrófagos (M0). A expressão de CD14 também foi determinada tanto em células precursoras da medula óssea quanto nos MDMO. As células precursoras (5×10^5 células) foram marcadas logo após a obtenção das células da medula óssea. Para a marcação dos MDMO, foram utilizados 5×10^5 células/poço cultivadas em placa de cultura de 48 poços por 24h (sem estímulo). As células foram fixadas com PBS-Formol 4%, por 11 minutos, seguido de lavagem com PBS 1X. Após a lavagem, as células foram incubadas por 20 minutos à 4°C com *Fc-Block* na proporção de 1:1 (v/v) e, posteriormente, adicionados os anticorpos monoclonais específicos conjugados com diferentes fluorocromos: anti-F4/80 PerCP-Cy5.5 (anti-mouse F4/80, clone BM8, eBioscience – San Diego, CA, EUA), anti-CD11b FITC (anti-mouse CD11b, clone M1/70, BD Bioscience – San Diego, CA, EUA) e anti-CD14 APC (rat anti-mouse CD14, clone SA2-8, eBioscience – San Diego, CA, EUA) durante 30 minutos. Após este período, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com PBS contendo 1% formaldeído. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto (Becton and Dickinson, San Jose, CA) com auxílio do *software* “FlowJo” (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

4.5 Estimulação dos MDMO *in vitro*

Os MDMO foram contados em câmara de Neubauer e mantidos em placas de cultura, nas seguintes condições: 5×10^5 células/poço (placas de 48 poços – para análise de citocinas, NO e mediadores lipídicos), $2,5 \times 10^5$ células/poço (placa de 24 poços – para análise de corpúsculos lipídicos), 1×10^6 células/poço (placa de 24 poços – para análise de expressão gênica) ou 1×10^5 células/poço (placa de 96 poços – para ensaio de viabilidade celular).

MDMO foram estimulados com 10 ou 500 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, sorotipo O111:B4) (Sigma, St. Louis, MI, EUA) diluído em meio RPMI 10/5 durante 24 horas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. MDMO mantidos nas mesmas condições, porém sem LPS, foram utilizados como controle. Outras condições experimentais também foram empregadas, nas quais os MDMO foram estimulados com 40 µM de AA (Cayman Chemical Co Ann Arbor, MI, EUA) (diluído em meio RPMI 10/5) concomitantemente com o LPS (10 ou 500 ng/mL) durante 24 horas.

Após este período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados à -20°C para quantificação de citocinas e NO. Os MDMO aderidos à placa, por sua vez, foram estimulados com 1 µM de ionóforo de cálcio A23187 (Sigma, St. Louis, MI, EUA) diluído em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) e suplementada com 2 mM de cloridrato de cálcio (CaCl₂) e 0,5 mM cloridrato de magnésio (MgCl) por 20 minutos à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após, a reação foi parada pela adição de metanol 1:1 (v/v) grau HPLC (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e as amostras foram armazenadas à -80°C para posterior identificação e quantificação de mediadores lipídicos.

4.6 Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes da cultura de MDMO foram utilizados para as dosagens das citocinas TNF-α e IL-10 (R&D - Minneapolis, MN, EUA). Para o ensaio imune enzimático (ELISA) placas de poliestireno de 96 poços foram recobertas com anticorpos de captura específicos para as citocinas-alvo. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com proteína irrelevante do tampão bloqueio. As amostras biológicas foram adicionadas e comparadas com curva padrão da citocina alvo (absorbância x concentração). Os anticorpos de detecção ligados à biotina foram adicionados e complexados com estrepto-avidina-peroxidase. Em seguida, a reação foi revelada pela adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB) (BD Bioscience – San Diego, CA, EUA) ou do substrato o- dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma, St. Louis, MI, EUA). Após 10-20 minutos, a reação foi parada pela adição do ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. As concentrações das citocinas foram obtidas através da

densidade óptica de cada amostra avaliada em espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Device – Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm. O limite de detecção nestes ensaios foi de 7 pg/mL.

4.7 Quantificação de óxido nítrico

Os sobrenadantes da cultura de MDMO também foram utilizados para a quantificação de NO pela dosagem indireta de nitrito (NO_2^-) através do método de Greiss (GREEN et al., 1982). Para isso, 50 μL dos sobrenadantes de cultura foram misturados com 50 μL da solução de reagente de Greiss, NEED 0,1% (Sigma, St. Louis, MI, EUA) e Sulfanilamida 1% (Sigma, St. Louis, MI, EUA) (1:1 *v/v*), em placa de 96 poços durante 5 minutos em temperatura ambiente. Uma curva padrão de nitrito, com valor inicial de 200 μM (concentração decrescente-base 2) foi utilizada para quantificação das amostras biológicas. A leitura de absorbância foi feita através de espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Device – Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 554 nm.

4.8 Quantificação de mediadores lipídicos

Conforme descrito no item 4.5, após a estimulação dos MDMO com ionóforo de cálcio A23187 (Sigma, St. Louis, MI, EUA), a reação foi parada pela adição de metanol 1:1 (*v/v*) grau HPLC (Merck, Kenilworth, NJ, EUA). Em seguida, foi adicionado solução de padrões internos deuterados, em concentrações conhecidas, nas amostras. Para determinação das concentrações dos EICs presentes nas amostras, curvas padrões foram determinadas utilizando padrões moleculares de analitos (Cayman Chemical Co Ann Arbor, MI, EUA). As amostras foram extraídas em colunas HyperSep C18 (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA) como previamente descrito pelo nosso grupo (SORGI et al., 2017). A fração lipídica retida na coluna foi eluída com metanol grau HPLC (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e o eluato foi seco em *speed vacuum* e reconstituído em 50 μL de metanol/água (7:3). Para identificação e quantificação dos mediadores lipídicos, foi utilizado o método de HPLC-MS/MS (SORGI et al., 2017). O processamento dos dados foi realizado pelos programas PeakView 2.1 e MultiQuant 3.0 (AB Sciex, Foster, CA, EUA) (SORGI et al., 2017). Os EICs analisados por este método estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Padrões analíticos empregados para a identificação e quantificação de mediadores lipídicos.

Padrões	Tempo de Retenção	Concentração (ng/mL)
20-OH-LTB ₄	3.06	500 – 2.3
LTC ₄	5.09	500 – 2.3
PGB ₂	8.70	500 – 2.3
15-keto-PGE ₂	5.99	500 – 2.3
20-OH-PGE ₂	1.80	500 – 2.3
TXB ₂	4.06	500 – 2.3
LXA ₄	5.93	500 – 2.3
PGD ₂	5.56	500 – 2.3
6-keto-PGF _{1α}	2.45	500 – 2.3
PGE ₂	5.20	500 – 2.3
RvD ₂	6.23	500 – 2.3
PGF _{2α}	4.63	500 – 2.3
19-OH-PGB ₂	2.28	500 – 2.3
PGG ₂	6.73	500 – 2.3
LTB ₄	10.54	500 – 2.3
LTD ₄	6.90	500 – 2.3
LTE ₄	7.90	500 – 2.3
6- <i>trans</i> -LTB ₄	10.09	500 – 2.3
11- <i>trans</i> -LTD ₄	6.90	500 – 2.3
PDx	10.40	500 – 2.3
MaR-1	10.21	500 – 2.3
PGH ₂	7.61	500 – 2.3
PGJ ₂	8.65	500 – 2.3
15-deoxy-δ-12,14-PGJ ₂	13.23	500 – 2.3
5-HETE	14.41	500 – 2.3
AA	17.17	500 – 2.3
5-oxo-EETE	14.68	500 – 2.3
20-HETE	13.35	500 – 2.3
5,6-DiHETE	12.91	500 – 2.3
12-HETE	14.22	500 – 2.3

8-HETE	14.22	500 – 2.3
11-HETE	14.08	500 – 2.3
12-oxo-ETE	14.69	500 – 2.3
15-oxo-ETE	13.99	500 – 2.3
11,12-DiHETrE	12.94	500 – 2.3
14,15-DiHETrE	12.73	500 – 2.3
EPA	16.71	500 – 2.3
5,6-DiHETrE	13.22	500 – 2.3
15-HETE	13.89	500 – 2.3
6-keto-PGF _{1α} -d ₄	2.45	150
TXB ₂ -d ₄	4.06	150
PGE ₂ -d ₄	5.20	150
PGD ₂ -d ₄	5.56	150
15-deoxi- δ -12,14-PGJ ₂ -d ₄	13.23	150
PGF _{2α} -d ₄	4.63	150
5-HETE-d ₈	14.41	150
12-HETE-d ₈	14.22	150
15-HETE-d ₈	13.89	150
5-oxo-ETE-d ₇	14.68	150
RvD ₁ -d ₄	6.21	150
LTC ₄ -d ₅	5.09	150
LTE ₄ -d ₅	7.90	150
AA-d ₈	17.17	150
LTD ₄ -d ₅	6.90	150
2- <i>epi</i> -LTB ₄ -d ₄	10.54	150

*500 - 2.3: diluições nas concentrações de 500; 333,3; 222; 148,1; 74; 37; 18,5; 9,2; 4,6 e 2,3 ng/mL.

4.9 Coloração e contagem dos corpúsculos lipídicos

Os MDMO (2,5 x 10⁵ células/poço) foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm e estimulados nas condições experimentais descritas no item 4.5 (**Figuras 1A e 1B**). Após este período, os sobrenadantes foram descartados e os MDMO aderidos foram fixados em solução de formaldeído 3,7% diluído em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) suplementada com 2 mM de CaCl₂ e 0,5 mM de MgCl (pH 7,4) por no mínimo 15 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada, foram

adicionados, com auxílio de uma pipeta Pasteur, 2 gotas de ácido cacodílico 0,1 M (pH 7,4) concomitante com 1 gota da solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) 1,5% (*m/v*) e incubadas livre de luz por 30 minutos em TA. Após lavagem por imersão em água destilada, foram adicionadas 2 gotas da solução de tiocarbohidrazina 1,0 % (*m/v*) diluída em água destilada por 3 minutos em TA, seguido de nova lavagem. Por fim, foram adicionados novamente 2 gotas de ácido cacodílico 0,1 M e 1 gota da solução de OsO_4 1,5% (*m/v*) e incubadas por 5 minutos, seguido de nova lavagem em água destilada. A morfologia das células foi observada e os CLs contados em microscópio óptico com objetiva e óleo de imersão (1000x) com o auxílio do software Zen Lite 2012.

4.10 Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-PCR

MDMO foram armazenados em Trizol® (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) à -80°C até o momento da extração do RNA total. As células foram homogeneizadas em 500 μL de Trizol e transferidas para tubo de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 200 μL de clorofórmio. Este conteúdo foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos à 4°C . A fase aquosa contendo o RNA foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo contendo 200 μL de etanol 70% (*v/v*). Para a purificação do RNA, foi utilizado o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA), conforme recomendações do fabricante. Após purificado, o RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) a 260 nm de absorbância, e armazenado à -80°C até a obtenção do cDNA. Para isto, utilizou-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems – Waltham, MA, EUA), conforme recomendações do fabricante, em termociclador *Veriti Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems) cujas temperaturas e tempo de incubação foram 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C até a retirada da amostra.

A expressão dos genes *Ptgds* (Mm.PT.58.31057341.g), *Ptgs2* (Mm.PT.58.9154407), *Ptgs2* (Mm.PT.58.7480753) (Integrated DNA Technology, Redwood City, CA, EUA) e *Gapdh* (Mm99999915_g1) (Life Technologies) foi avaliada nos tratamentos dos MDMO. A expressão gênica em tempo real foi analisada empregando o sistema TaqMan e o equipamento de PCR em Tempo Real Step One Plus (Applied Biosystems). Todos os valores da expressão dos genes citados acima foram normalizados pelos valores da expressão do gene constitutivo *Gapdh*. Para a construção do gráfico, a expressão gênica dos MDMO não estimulados dos camundongos selvagens (C57BL/6) foram consideradas amostras de referência, sendo o $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (expressão relativa) igual a 1 (PAULA-SILVA et al., 2016). Valores indeterminados

foram definidos com um CT (*Threshold Cycle*) máximo (CT = 40) (GONI; GARCÍA; FOISSAC, 2009; MCCALL et al., 2014, p.).

4.11 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

Foi realizado o ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) para avaliar a viabilidade celular dos MDMO empregando método descrito por Mosmann (MOSMANN, 1983). Para isso, os sobrenadantes da cultura de MDMO (1×10^5 células/poço cultivadas em placa de cultura de 96 poços) foram descartados e foram adicionados, por poço, 10 μ L da solução de MTT (5 mg/mL) diluída em 150 μ L de RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA) incompleto. As células foram incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 3 horas. Após este período, foram adicionados 50 μ L de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% diluído em ácido clorídrico (HCl) 0,01M (*m/v*). As células foram incubadas em temperatura ambiente por 24 horas e a leitura realizada utilizando espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Device – Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda 570 nm.

4.12 Análise Estatística

Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando a análise de variância (*One-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey e, para comparação entre duas amostras não pareadas, foi utilizado o teste de *t-Student*, por meio do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças que apresentaram valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 A expressão de CD14 aumenta significativamente em MDMO

Embora tenhamos utilizado o protocolo clássico para diferenciação de macrófagos *in vitro* (MARIM et al., 2010), a diferenciação dos precursores da medula óssea em MDMO foi confirmada por fenótipo celular. Para tanto, avaliamos a expressão dos marcadores de superfície F4/80 e CD11b por citometria de fluxo (**Figura 1A**). Também, determinamos se células precursoras da medula óssea e os MDMO diferenciados expressavam o receptor CD14. Foi utilizada uma estratégia de *gate* que separasse os *singlets* (células únicas) e excluísse as células mortas, para então determinar a expressão de CD14, tanto nos precursores de medula óssea (**Figura 1B**), quanto nos MDMO (**Figura 1C**). A **Figura 1D** demonstra que apenas 20% das células precursoras de medula óssea expressam CD14, em contraste com mais de 80% em MDMO. O aumento na expressão de CD14 em MDMO foi também confirmado considerando a análise da densidade do receptor na superfície celular (MIF) (**Figura 1E**).

Figura 1. MDMO expressam mais CD14 do que células precursoras da medula óssea. Células foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6 e incubadas em meio RPMI 20/30 para diferenciação em MDMO por 7 dias. **(A)** MDMO (5×10^5 células/tubo) foram marcados com anticorpos anti-F4/80 e anti-CD11b e analisadas por citometria de fluxo. **(B)** Células precursoras da medula óssea (5×10^5 células/tubo) e **(C)** MDMO (5×10^5 células/tubo) também foram marcados com anticorpo anti-CD14, utilizando a estratégia de *gate* para separação dos *singlets*, exclusão de células mortas e inclusão de células positivas para CD14. **(D)** Porcentagem de células CD14 positivas antes e após diferenciação. **(E)** Média de intensidade de fluorescência (MIF) indicando a densidade de moléculas CD14 na superfície celular antes e após diferenciação. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 2 experimentos independentes ($n = 3$ / por experimento) e analisados pelo teste de *t-Student*. *indica a diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

5.2 Determinação das concentrações de LPS para ativação de MDMO

A molécula CD14 foi inicialmente descrita como co-receptor de TLR4 para o reconhecimento de LPS, que promove ativação clássica de macrófagos (DOBROVOLSKAIA; VOGEL, 2002). Por isto, primeiramente realizamos experimentos de concentração-resposta utilizando diferentes concentrações de LPS na estimulação de MDMO e avaliamos a produção de NO, visto que a sinalização por TLR4 induz a produção deste mediador (BILLACK, 2006; GATTO et al., 2015). Na **Figura 2**, observamos aumento da produção de NO proporcional ao aumento da concentração de LPS. Embasados nestes resultados, nos experimentos subsequentes, utilizamos duas concentrações de LPS: 10 ng/mL (denominada de baixa concentração) e 500 ng/mL (denominada alta concentração).

Figura 2. Curva concentração-resposta de estimulação com LPS para produção de NO por MDMO. MDMO de camundongos das linhagens C57BL/6 (5×10^5 células/poço) foram estimulados, ou não, com concentrações crescentes de LPS (10, 100, 250 ou 500 ng/mL) durante 24 horas em placa de cultura de 48 poços. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para dosagem de NO. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 1 experimento ($n = 3$ /poço/condição) e analisados pelo teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos indicam as diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$): *em relação ao meio; #em relação ao LPS 10 ng/mL; &em relação ao LPS 100 ng/mL; \$em relação ao LPS 250 ng/mL.

5.3 As moléculas CD14 e TLR4 medeiam a produção de NO, TNF- α e IL-10 por MDMO estimulados com alta ou baixa concentrações de LPS

Após a padronização do protocolo a ser empregado, determinamos a produção de NO, TNF- α e IL-10 pelos MDMO estimulados com LPS. Para isso, utilizamos MDMO de uma linhagem de camundongos deficientes da molécula CD14 (CD14^{-/-}), bem como outra deficiente da molécula TLR4 (TLR4^{-/-}), para determinar a importância destes receptores na ativação destas células. MDMO da linhagem C57BL/6 (selvagem) foram empregados para comparação, e denominados de controles.

Como observamos na **Figura 3A**, a produção de NO por MDMO foi dependente das moléculas CD14 e TLR4, tanto empregando alta como baixa concentração de LPS. Também, em MDMO estimulados com 10 ng/mL de LPS, a produção de TNF- α por foi totalmente dependente das moléculas CD14 e TLR4 (**Figura 3B**). Contudo, em MDMO estimulados com alta concentração de LPS (500 ng/mL) a deficiência de CD14 reduziu parcialmente, enquanto a deficiência de TLR4 inibiu a síntese de TNF- α . Por outro lado, a produção de IL-10 foi parcialmente dependente das moléculas CD14 e TLR4 em ambas as concentrações de LPS (**Figura 3C**).

Figura 3. Dependência de CD14 e TLR4 para a produção de NO, TNF- α e IL-10 por MDMO estimulados com alta ou baixa concentração de LPS. MDMO de camundongos das linhagens C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} (5×10^5 células/poço) foram estimulados ou não, com LPS (10 ou 500 ng/mL) durante 24 horas em placa de cultura de 48 poços. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para quantificação de (A) NO, (B) TNF- α e (C) IL-10. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 4 experimentos independentes ($n = 3$ /poço/condição) e analisados pelo teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos indicam as diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$): *em relação ao meio (na mesma linhagem); #LPS 10 ou 500 ng/mL C57BL/6 versus CD14^{-/-} ou TLR4^{-/-}; &LPS 10 ou 500 ng/mL CD14^{-/-} versus TLR4^{-/-}; %LPS 10 ng/mL versus LPS 500 ng/mL (entre a mesma linhagem).

5.4 CD14 é necessário para induzir a expressão dos genes *Ptgs2* e *Ptges2* por MDMO estimulados com LPS

Em seguida, MDMO foram estimulados com alta concentração de LPS por 2, 4 e 24 h e avaliamos a expressão dos genes que codificam as enzimas: prostaglandina endoperóxido sintase-2 (ou COX-2, isoforma induzida) (*Ptgs2*), PGE₂ sintase (*Ptges2*) e PGD₂ sintase (*Ptgds*). Na **Figura 4** podemos observar a expressão dos genes citados acima, após os diferentes tempos de estímulo. Observamos que em todos os períodos de estímulo com 500 ng/mL de LPS, a expressão de *Ptgs2* foi dependente da molécula TLR4, mas parcialmente dependente da molécula CD14, quando comparada com o seu controle (**Figura 4A**). A expressão de *Ptges2* em 24 horas foi dependente dos dois receptores (**Figura 4B**). Porém, o mesmo efeito não foi observado em relação à expressão de *Ptgds* (**Figura 4C**), quando comparados com o controle. A expressão de *Ptgds* em 2 horas após a estimulação foi significativamente maior em MDMO deficientes da molécula CD14, quando comparado com as células dos animais WT ou TLR4^{-/-} (**Figura 4C**).

Além disso, podemos observar a regulação positiva e negativa destes genes, expressa pelo *fold-change* (log2). Com 2h de estímulo, a expressão de *Ptgs2* é regulada negativamente em MDMO deficientes das moléculas CD14 e TLR4 (**Figura 4D**). A partir de 6h, essa expressão é regulada positivamente em MDMO CD14^{-/-}, mas permanece negativamente regulada nos TLR4^{-/-} em relação ao seu controle selvagem (**Figura 4E**). A expressão de *Ptges2* mostra-se regulada negativamente em todos os tempos de MDMO selvagens estimulados, assim como, em 24h pelos MDMO de CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} (**Figura 4F**), sendo estes dois estatisticamente significantes em relação ao controle. Apesar da expressão de *Ptgds* estar negativamente regulada em 2h nos MDMO selvagens e deficientes da molécula TLR4, não há diferenças estatísticas entre os grupos e tempos.

Figura 4. CD14 e TLR4 regulam a expressão dos genes *Ptgs2* e *Ptges2*, em MDMO estimulados com alta concentração de LPS. MDMO de camundongos das linhagens C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} (1×10^6 células/poço) foram estimulados com 500 ng/mL de LPS por 2, 6 e 24 horas em placa de cultura de 24 poços. Como controle foi utilizado MDMO não estimulados (representado por 0 h). As células foram lisadas para posterior extração do RNA total e síntese de cDNA. Em seguida, os transcritos que codificam os genes da via dos prostanoídeos (*Ptgs2*, *Ptges2* e *Ptgs2*) foram mensurados através da técnica de RT-PCR. Os resultados foram normalizados pela quantidade da expressão do controle interno endógeno *Gapdh*. Valores indeterminados foram definidos com um CT máximo (CT = 40). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 1 experimento (n = 3/ poço/ condição) e analisados pelo teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos indicam as diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$): *em relação ao C57BL/6; \$ em relação ao CD14^{-/-}; # C57BL/6 versus CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} e & CD14^{-/-} versus TLR4^{-/-}.

5.5 A formação de CLs em MDMO estimulados com LPS é regulada pelas moléculas CD14 e TLR4

Como durante o processo inflamatório, macrófagos aumentam a formação de CLs (BOZZA; VIOLA, 2010), os quais são fontes importantes de mediadores lipídicos (BOZZA et al., 2011), nosso próximo passo foi avaliar se as moléculas CD14 e TLR4 influenciam a formação destas organelas após estímulos com LPS. A **Figura 5A** mostra fotografia de campo claro de MDMO contendo os CLs após coloração com tetróxido de ósmio. Na **Figura 5B** estão representadas as porcentagens de MDMO contendo CLs. Podemos observar que MDMO de C57BL/6 apresentam maior porcentagem desta organela, quando comparados com os deficientes das moléculas CD14 ou TLR4, estimulados com alta ou baixa concentrações LPS. Na **Figura 5C**, mostramos o número total de CLs presentes nas células. Observamos que os MDMO de animais CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} formam menor número de CLs quando comparados com os C57BL/6, em ambas as concentrações de LPS. Estes dados sugerem que a sinalização intracelular mediada pelos receptores CD14 e TLR4 está diretamente envolvida na formação de CLs em resposta ao LPS.

Figura 5. A formação de CLs em MDMO estimulados com LPS é reduzida em células deficientes de CD14 ou TLR4. MDMO de camundongos das linhagens C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} ($2,5 \times 10^5$ células/ poço) foram estimulados, ou não, com LPS (10 ou 500 ng/mL) durante 24 horas em placa de cultura de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e as lamínulas coradas com tetróxido de ósmio para contagem de CLs. **(A)** Fotos de microscopia em campo claro dos MDMO contendo CLs (indicados pelas setas vermelhas). **(B)** Porcentagem de células positivas para CLs e **(C)** número total de CLs presentes nos MDMO positivos. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 2 experimentos independentes com **(B)** $n = 8$ e **(C)** $n = 80$ e analisados pelo teste *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos indicam as diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$): *em relação ao meio (entre a mesma linhagem); #LPS 10 ou 500 ng/mL C57BL/6 versus CD14^{-/-} e TLR4^{-/-}; %LPS 10 ng/mL versus LPS 500 ng/mL (entre a mesma linhagem).

5.6 CD14 regula a produção de TXB₂ e PGE₂ por MDMO estimulados com LPS

Utilizando da técnica de HPLC-MS/MS, determinamos a produção de prostanoídeos em resposta ao LPS por MDMO e analisamos a dependência de CD14 e/ou de TLR4. Para tanto, o potencial metabólico dos MDMO em produzirem os EICs, foi analisado após estimulação inespecífica com ionóforo de cálcio, como já descrito (SORGI et al., 2017). Podemos observar que após 24 h de pré-estímulo com 500 ng/mL LPS, a produção de TXB₂ aumentou apenas em MDMO de animais C57BL/6, após estimulação com ionóforo de cálcio (**Figura 6A**). Estes resultados demonstraram que CD14 e TLR4 são importantes para a preparação do metabolismo de TXB₂ por MDMO estimulados com alta concentração de LPS. Também observamos aumento significativo na produção de PGE₂ por MDMO de animais C57BL/6 após pré-estimulação com as duas concentrações de LPS (**Figura 6B**). No entanto, MDMO de animais CD14^{-/-} apenas aumentaram a produção de PGE₂ após pré-estímulo com 500 ng/mL de LPS, enquanto os MDMO deficientes da molécula TLR4 não produziram este mediador acima dos níveis basais em nenhuma das condições (**Figura 6B**). Além disso, observamos maior produção de PGD₂ por MDMO de C57BL/6 quando estimulados com alta concentração de LPS (**Figura 6C**), a qual foi dependente apenas da presença de TLR4. Outros mediadores lipídicos, como PGF_{2α} (**Figura 6D**), 5-HETE (**Figura 6E**) e 15-HETE (**Figura 6F**) também foram avaliados. No entanto, não houve diferença estatística quanto à produção destes EICs entre os MDMO selvagens ou deficientes pré-estimulados com LPS, quando comparados aos respectivos controles não estimulados.

Figura 6. CD14 e TLR4 regulam a produção de prostanoídeos por MDMO pré-estimulados com LPS e tratados com ionóforo de cálcio. MDMO de camundongos das linhagens C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} (5×10^5 células/ poço) foram pré-estimulados ou não com LPS (10 ou 500 ng/mL) durante 24 horas em placa de cultura de 48 poços. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e as células estimuladas com 1 μ M de ionóforo de cálcio A23187 por 20 minutos em estufa a 37°C. Após extração dos lipídios, estes foram analisados e quantificados empregando HPLC-MS/MS. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 5 experimentos independentes ($n = 3$ /poço/condição) e analisados pelo teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos indicam as diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$): *em relação ao meio (entre a mesma linhagem); #LPS 10 ou 500 ng/mL C57BL/6 *versus* CD14^{-/-} e TLR4^{-/-}, %LPS 10 ng/mL *versus* LPS 500 ng/mL (entre a mesma linhagem).

5.7 Avaliação da formação de CLs em MDMO na presença de AA, o qual não é ligante de CD14 e TLR4.

Após determinarmos a influência das moléculas de CD14 e TLR4 na formação de CLs após estimulação com LPS, investigamos se a deficiência da expressão destes receptores altera a formação destas organelas após tratamento das células com AA, que é uma substância não ligante destas moléculas. Para isso, tratamos os MDMO com AA (por longo período – 24 horas), seguido da incubação ou não com LPS pelo mesmo período. Na **Figura 7** estão representados os MDMO contendo CLs, e as porcentagens dos mesmos. Podemos observar que MDMO de animais C57BL/6 (**Figuras 7A e B**), e aqueles obtidos de animais deficientes das moléculas CD14 (**Figuras 7C e D**) ou de TLR4 (**Figuras 7E e F**), apresentam resultados similares. Estes dados sugerem que a sinalização celular para a formação de CLs após tratamento com AA é independente de CD14 ou de TLR4. Interessante que, a pós-estimulação com LPS, em ambas as concentrações, não houve alteração na formação de CLs nos MDMO (**Figura 7**).

Figura 7. AA induz formação de CLs em MDMO independente das moléculas CD14 e TLR4. MDMO de camundongos das linhagens C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram estimulado com 40 μ M de AA, concomitantemente ou não com LPS (10 ou 500 ng/mL), durante 24 horas em placa de cultura de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e as lamínulas coradas com tetróxido de ósmio para contagem de corpúsculos lipídicos. Porcentagem de células positivas (**A**, **C** e **E**) e número total de corpúsculos lipídicos presentes nos MDMO positivos (**B**, **D** e **F**). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 1 experimento independente com (**A**, **C** e **E**) $n = 3$ e (**B**, **D** e **F**) $n = 40$ e analisados pelo teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos indicam as diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$): *em relação ao meio; #LPS 10 ou 500 ng/mL versus AA+LPS 10 ou 500 ng/mL.

5.8 O estímulo com AA por longo período e concomitante ou não com LPS, modula a produção de mediadores lipídicos.

Avaliamos o efeito do tratamento com AA por longo período (24 horas) e concomitantemente ou não com a presença de LPS na produção de EICs. Como mostra a **Figura 8**, os MDMO não produziram quantidades detectáveis de LTs, mesmo após tratamento com AA por 24 horas. Contudo, outros EICs foram detectados, quais sejam TXB₂, PGE₂, PGD₂, 5-HETE e 15-HETE. Ainda observamos diminuição na produção de TXB₂ (**Figura 8A**) e PGE₂ (**Figura 8D**) por MDMO C57BL/6 e tratados com AA (longo período) e incubados com 500 ng/mL de LPS. Também, MDMO CD14^{-/-} (**Figura 8B**) liberaram menos destes prostanoides, nas mesmas condições experimentais do C57BL/6. Em contraste, observamos que em MDMO CD14^{-/-} cultivados nas mesmas condições e estimulados com baixa e alta concentração de LPS, produzem mais PGD₂ (**Figura 8H**), assim como MDMO TLR4^{-/-} estimulados com 500 ng/mL de LPS (**Figura 8I**). Interessante, que AA por longo período, aumentou a produção de 5-HETE (**Figuras 8J, K e L**) e 15-HETE (**Figuras 8M, N e O**) por todas as linhagens de MDMO, quando comparado com células controle.

Figura 8. Produção de EICs por MDMO de animais C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} é influenciada por tratamento de longo tempo com AA seguido de pré-estimulação com LPS. MDMO de camundongos C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} (5×10^5 células/poço) foram tratados com 40 μ M de AA concomitantemente ao LPS (10 ou 500 ng/mL) durante 24 horas em placa de cultura de 48 poços. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e as células estimuladas com 1 μ M de ionóforo de cálcio A23187 por 20 minutos em estufa à 37°C. Posteriormente foi realizada a extração dos lipídios e análise através de HPLC-MS/MS. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM representativos de 2 experimentos independentes ($n = 3$ / poço/ condição) e analisados pelo teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Os símbolos indicam as diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$): *em relação ao meio; %LPS 10 n/mL *versus* LPS 500 ng/mL; #LPS 10 ou 500 ng/mL *versus* AA+LPS 10 ou 500 ng/mL.

5.9 AA exógeno não induz morte celular de MDMO estimulados com LPS

Por fim, realizamos ainda o ensaio de MTT para verificar a viabilidade celular dos MDMO após tratamento com AA na presença ou ausência de LPS (**Figuras 9A, B e C**). Para isto, utilizamos duas condições: na **condição A**, os MDMO foram pré-tratados com AA por somente 10 minutos (o qual foi retirado após este período) seguida da estimulação com LPS (10 ou 500 ng/mL) por 24 horas; na **condição B**, os MDMO foram estimulados com AA concomitantemente com o LPS (10 ou 500 ng/mL) durante 24 horas. Observamos que tanto na **condição A** quanto na **condição B** não houve morte celular em nenhuma das três linhagens empregadas (C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-}).

Figura 9: LPS ou AA não induzem morte de MDMO. Macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) de camundongos das linhagens C57BL/6, CD14^{-/-} e TLR4^{-/-} (1×10^5 células/poço) foram pré-tratados somente por 10 minutos (condição A), e depois estimulados ou não com LPS (10 ou 500 ng/mL) por 24 horas; ou estimulado, ou não, concomitantemente com 40 μ M de AA e LPS (10 ou 500 ng/mL) durante 24 horas (condição B), em placa de cultura de 96 poços. Após esse período, os sobrenadantes foram descartados e as células incubadas com solução de MTT para ensaio de viabilidade celular. Resultado representativo de 1 experimento independente ($n = 3/\text{poço}/\text{condição}$).

Discussão

6 DISCUSSÃO

A molécula CD14 foi inicialmente descrita por seu papel no reconhecimento do LPS e na indução da resposta imune inata (HAILMAN et al., 1994; WRIGHT, 1995). Sabe-se que esta molécula atua como co-receptor de TLR4 (CHOW et al., 1999; POLTORAK et al., 1998), embora também auxilie na ativação mediada por outros TLRs (BAUMANN et al., 2010; LEE et al., 2006; RABY et al., 2013). Hoje sabe-se que o CD14 também regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos (ZOCCAL et al., 2014, 2018). Contudo a contribuição desta molécula para a ativação da COX-2 e consequente síntese de prostanoídes, bem como para a formação de CLs, ainda não é totalmente conhecida. Em razão disto, a compreensão do papel do CD14 neste contexto é relevante para o entendimento dos mecanismos que atuam na resposta inflamatória induzida por infecções por bactérias Gram-negativas.

Neste trabalho, utilizamos MDMO por exibirem características fisiológicas semelhantes aos macrófagos derivados de monócitos *in vivo*, sendo, portanto, mais recomendados para investigação da interação macrófago-patógeno (TROUPLIN et al., 2013). Assim, para a caracterização do modelo, primeiramente mostramos que CD14 é expresso por progenitores provenientes da medula óssea, e que MDMO tem sua expressão aumentada. Estes dados corroboram estudos anteriores que demonstraram alta expressão de CD14 em MDMO (ZANONI et al., 2011). Ainda, confirmamos que estas células expressam os marcadores clássicos F4/80 e CD11b (YING et al., 2013; ZHANG; GONCALVES; MOSSER, 2008).

Inicialmente avaliamos a participação do CD14 na ativação dos MDMO e na produção de mediadores da inflamação por estas células. O NO é um importante mediador inflamatório produzido por macrófagos, e é citotóxico para patógenos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Outros autores já descreveram o papel do CD14 na regulação da produção do NO (MOON; PYO, 2000; SAITO et al., 2000) e mostraram que células da linhagem J7.DEF.3 (derivada de macrófagos da linhagem J774.1), que possui defeito na expressão da molécula mCD14, não expressam iNOS quando comparado à sua linhagem controle, indicando que o mCD14 é necessário para a produção de NO após estimulação com baixas concentrações de LPS (SAITO et al., 2000). Além disso, o pré-tratamento de macrófagos peritoneais de camundongos (antes de serem estimulado com LPS) com anticorpos anti-CD14 inibiu a produção de NO (MOON; PYO, 2000). Em nossos resultados observamos que MDMO deficientes tanto da molécula CD14 quanto da TLR4 não produzem NO mesmo após estimulação com baixa ou alta concentração de LPS. Estes resultados, além de corroborar os

encontrados na literatura, demonstram que CD14 é um importante indutor da produção de NO.

Outras funções têm sido descritas para o CD14. Em modelo *in vivo* de sepse, demonstraram diminuição significativa de IL-10 no plasma de camundongos deficientes da molécula CD14, quando comparados ao seu controle selvagem (EBONG et al., 2001). Este mesmo fenômeno também foi observado em modelo *in vitro* utilizando macrófagos e monócitos humanos, após estas células serem tratadas com anticorpos anti-CD14 (CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 2010). Nossos resultados foram semelhantes aos da literatura, uma vez que em MDMO deficientes de CD14 (ou de TLR4) após estímulo com LPS, a produção desta citocina foi significativamente menor quando comparado com células selvagens competentes. Em estudo anterior, nosso grupo de pesquisa demonstrou que macrófagos peritoneais deficientes da molécula CD14, quando estimulados *in vitro* com a peçonha bruta de escorpião *T. serrulatus* (TsV), produzem significativamente menos TNF- α por quando comparados com o seu controle selvagem (ZOCCAL et al., 2014). HE e colaboradores (2016) também observaram que a em células dendríticas derivadas da medula óssea, a produção TNF- α é totalmente dependente do CD14 quando o LPS está em baixas concentrações (10 e 100 ng/mL), e independente quando na presença de alta concentração de LPS (1.000 ng/mL). Ainda, utilizando células dendríticas derivadas da medula óssea deficientes da molécula TLR4, observaram que este receptor é essencial para a síntese de TNF- α em todas as concentrações de LPS. Além disso, outros autores avaliaram a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais (PERERA et al., 1997) estimulados com 1, 10, 1.000 e 10.000 ng/mL de LPS durante 4 horas e também relataram a dependência do CD14 para a produção de TNF- α em baixas concentrações de LPS (1 e 10 ng/mL) e independência em altas concentrações (1.000 e 10.000 ng/mL). Resultados semelhantes foram observados em células RAW264 pré-tratadas com anticorpo anti-CD14 seguida de estimulação durante 4 horas com diferentes concentrações de LPS (1, 10, 100 e 1.000 ng/mL). Já em células J774, a produção de TNF- α mostrou ser totalmente dependente de CD14 quando na presença de baixa concentração de LPS (10 ng/mL), e parcialmente dependente quando na presença de altas concentrações (100 e 1.000 ng/mL) deste estímulo (BORZECKA et al., 2013). Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados na literatura, uma vez que a produção de TNF- α por MDMO estimulados com baixa concentração de LPS (10 ng/mL) foi totalmente dependente do CD14, mas somente parcialmente dependente na presença de alta concentração (500 ng/mL). No entanto, quando estimulados por ambas as concentrações de LPS, a produção de TNF- α por MDMO foi totalmente dependente da molécula TLR4.

Esse mesmo padrão de resposta (ativação celular dependente de CD14 quando na presença de baixa concentração de LPS, mas independência quando na presença de alta concentração de LPS) também foi observado em relação à produção de prostanoídes. MDMO deficientes da molécula CD14 foram capazes de sintetizar PGE₂ somente quando estimulados com alta concentração de LPS, indicando que a ativação do TLR4 pode acontecer de maneira dependente ou independente da molécula CD14. Uma possível explicação para esse fenômeno pode ser o fato de que tanto o TNF- α quanto a COX-2, enzima responsável pela síntese de prostanoídes, podem ser induzidos via ativação de NF- κ B após reconhecimento do LPS por TLR4 e independente de CD14 (HAN et al., 2017; HUANG; HUANG; DENG, 2012). Contudo, além da sinalização via TLR4, já foi demonstrado também que o CD14 é capaz de sinalizar sozinho através da ativação do NFAT (ZANONI; GRANUCCI, 2013). Da mesma forma, o NFAT é capaz de regular a produção de TNF- α (FALVO; TSYTSYKOVA; GOLDFELD, 2010; TSYTSYKOVA; GOLDFELD, 2000) bem como induzir a ativação de COX-2 e subsequente produção de PGs (YIU; TOKER, 2006). Assim, sugerimos que, em baixas concentrações de LPS, o CD14 é importante para apresentar este lipopolissacarídeo ao TLR4, e que a produção desses mediadores inflamatórios estaria ocorrendo via ativação de NFAT. No entanto, em altas concentrações de LPS, o CD14 é dispensável para a ativação do TLR4, sendo que este fenômeno pode estar acontecendo via NF- κ B. Contudo, estudos mais aprofundados sobre as vias de sinalização são necessários para melhor compreensão destes resultados.

A produção de TNF- α , a expressão de COX-2 e a indução da enzima iNOS, em macrófagos, ocorrem via ativação de NF- κ B após estimulação com LPS (JONES et al., 2007; LI et al., 2002). Contudo, a produção de NO não foi observada após estímulo com alta concentração de LPS (apenas de TNF- α e PGE₂), sugerindo que a ausência da molécula CD14 possa estar impedindo a ativação de alguma molécula importante na cascata de sinalização intracelular que antecede a ativação do fator de transcrição NF- κ B. A produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS também pode ser desencadeada via ativação de NF- κ B (SARAIWA et al., 2005). Contudo, mesmo estimulados com alta concentração de LPS, MDMO possuem uma baixa produção de IL-10. Assim como visto nos resultados de NO, a produção de IL-10 pode estar sendo prejudicada pela ausência de CD14, visto que este pode ser importante na ativação de alguma molécula que esteja antecedendo a ativação do NF- κ B durante a sinalização. Além disso, também existe a possibilidade do CD14 ser importante para a ativação de outras vias de sinalização. Sabe-se que a via das proteínas quinases ativadas por

mitógenos (MAPK) e o fator de transcrição Sp1 são importantes para a produção de IL-10 quando induzidos por LPS (CHANTEUX et al., 2007).

Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que as moléculas CD14 e CD36 são responsáveis por iniciar sinalizações intracelulares, que resultam na ativação de enzimas que controlam tanto o metabolismo de eicosanoides, como também, a síntese de citocinas inflamatórias e AMPc, por macrófagos estimulados com TsV (ZOCCAL et al., 2018). Naquele artigo foi demonstrado que a presença do CD14 é indispensável para a inflamação, produção de PGE₂, além da indução de formação de AMPc e liberação de IL-1β. Estes mediadores induzem a inflamação e a consequente morte de animais envenenados com a peçonha do escorpião (ZOCCAL et al., 2018). Entretanto, sinais desencadeados via CD36 induzem resposta anti-inflamatória, diminuição da produção de PGE₂ e aumento da síntese de LTB₄, com consequente aumento da sobrevivência dos animais (ZOCCAL et al., 2018). Além disso, também mostramos recentemente que MDMO não produzem LTB₄, mesmo quando estimulados com LPS (SORGI et al., 2017). Entretanto, notamos que CD14 foi importante para a produção de PGE₂ e TXB₂ por MDMO estimulados com alta concentração de LPS. A dependência do CD14 para a produção de PGE₂ foi demonstrada em células dendríticas derivadas da medula óssea (ZANONI et al., 2012). Estas células, deficientes da molécula CD14, apresentavam menor expressão relativa de *Ptges-1* quando comparadas com seu controle selvagem após estimulação com 1 µg/mL de LPS, além de produzirem menos PGE₂ após 4 horas de estimulação com LPS (1 µg/mL) (ZANONI et al., 2012). Em nossos resultados observamos dados semelhantes, uma vez que o CD14 mostrou-se importante tanto para a expressão de *Ptgs2* (COX-2) em 2, 6 e 24 horas após estímulo com 500 ng/mL de LPS, e *Ptgs2* (PGE₂-sintase) apenas após 24 horas. Cabe ressaltar que os MDMO foram pós-estimulados com ionóforo de cálcio (após 24 horas de estímulo com LPS) para posterior identificação e quantificação de EICs empregando o método de HPLC-MS/MS (SORGI et al., 2017). Sabe-se que O íon cálcio atua como segundo mensageiro na sinalização celular (CIOFFI; BARRY; STEVENS, 2011) e assim, ionóforo de cálcio é capaz de aumentar a liberação de eicosanoides em comparação às células não estimuladas, primadas ou não com LPS (KITA et al., 2005). Nossos dados, e outros da literatura, demonstraram que o ionóforo de cálcio sozinho é capaz de estimular a síntese de mediadores lipídicos de modo não específico, justificando assim o aumento destes compostos, principalmente de PGD₂ e 5-HETE. Assim, podemos sugerir que a produção de mediadores lipídicos ocorre após dois sinais: 1º sinal leva à expressão e ativação das enzimas responsáveis pela formação dos EICs, o que ocorre geralmente após estimulação das células via receptores da imunidade inata, os quais são

específicos e levam à sinalização intracelular (como, por exemplo, LPS); 2º sinal, necessário para a liberação dos EICs formados, sendo este dependente da elevação da concentração de cálcio intracelular, como ocorre, por exemplo, após ionóforo de cálcio. Alguns estímulos podem atuar no primeiro e no segundo sinal para a formação de EICs. Outros agem principalmente no primeiro sinal, necessitando de um pós-estímulo para que ocorra a liberação dos EICs.

Além da produção de EICs derivados de membranas (via clássica), também se sabe que os EICs podem ser derivados dos CLs (BOZZA et al., 2011). Os CLs são formados de maneira específica e dependente de estímulo (BANDEIRA-MELO; PHOOFOLO; WELLER, 2001; BOZZA et al., 1996, 1998), sendo apresentados em maiores quantidades no citoplasma de células durante o processo inflamatório (BOZZA; VIOLA, 2010). O metabolismo de lipídios é assim regulado por CLs (BOZZA; VIOLA, 2010), sendo estes grandes responsáveis pela produção de EICs (CHAP, 2016). A molécula CD14 já foi descrita estar envolvida na biogênese desses CLs. Foi demonstrada a diminuição da formação de CLs por macrófagos peritoneais de animais deficientes da molécula CD14 após estimulação *in vitro* com BCG (*Mycobacterium bovis*) (ALMEIDA et al., 2014), assim como após o tratamento *in vitro* de macrófagos peritoneais com anticorpo anti-CD14, seguido da estimulação com LPS (PACHECO et al., 2002). Nossos resultados corroboram os da literatura, pois mostraram que a presença da molécula CD14 é indispensável para a geração dos CLs, uma vez que MDMO deficientes da molécula CD14 estimulados tanto com baixa ou alta concentração de LPS não modificaram a produção de CLs em relação ao basal. Quando correlacionamos a formação de CLs com produção de prostanoídes, observamos que a produção de PGE₂ por MDMO estimulados com alta concentração de LPS pode não ser originado dos CLs. Sugerimos assim, que a formação de CLs pode ser dispensável para o metabolismo de PGs na ausência de CD14, e que outros mecanismos compensatórios, como exemplo o AA oriundo das membranas celulares, podem suprir a ausência dos CLs.

Como mencionado acima, recentemente demonstramos que, embora os MDMO expressem a 5-LO, os mesmos não produzem LTs, ainda que estimulados com LPS (SORGI et al., 2017). Contudo, este quadro é revertido quando estas células são estimuladas com AA exógeno, seguido da incubação com ionóforo de cálcio. Nesta situação, as células passam a sintetizar pequena, mas significativa quantidade de LTs (SORGI et al., 2017). Além disso, outros trabalhos também demonstraram que AA é capaz de induzir a formação de CLs (GUIJAS et al., 2012; MOREIRA et al., 2009). Assim, para determinarmos se a ausência de CD14 seria importante para formação de CLs e produção de EICs independente de ligantes

específicos, avaliamos a formação de CLs nos MDMO de animais CD14^{-/-} estimulados com AA. Quando observamos a produção de CLs nestas condições experimentais, observamos que há aumento na formação de CLs nos MDMO estimulados com AA, sendo que a formação desta organela foi independente das moléculas CD14 e TLR4. Além disso, não observamos efeito aditivo na formação de CLs, quando as células foram incubadas conjuntamente com AA e LPS. Podemos sugerir, que na presença de AA já ocorre o máximo de formação de CLs (*efeito teto*). Quando comparamos a formação dos CLs induzidos por AA com a síntese de EICs, notamos aumento na produção de 5-HETE e 15-HETE, sugerindo que ocorre ativação de 5-LO e 15-LO. Porém, não detectamos a produção de LTs, como publicados anteriormente por Sorgi e colaboradores (2017). Isto ocorreu possivelmente pela diferença no tempo de incubação com AA, pois Sorgi e colaboradores (2017) adicionaram este ácido graxo somente nos 10 minutos finais de incubação das células.

Com objetivo de esclarecer a origem dos prostanoídeos (se da membrana celular ou dos CLs), os MDMO foram estimulados concomitantemente com AA e LPS durante 24 horas. Assim, observamos diminuição na produção de TXB₂ por MDMO CD14^{-/-}. Observamos também diminuição da produção de PGE₂ por MDMO selvagens estimulados com alta concentração de LPS. Em contraste a produção de PGD₂ por MDMO CD14^{-/-} foi significativamente maior tanto quando estimulados tanto com baixa quanto com altas concentrações de LPS. Além disso, nessas mesmas condições, observamos aumento da produção de 5-HETE e 15-HETE pelas três linhagens de MDMO. Uma possível explicação para a diminuição da produção de PGs pode ser o fato do AA atuar como primeiro e segundo sinais para a formação de EICs (além de ser o substrato destes mediadores lipídicos), e assim preparar as células para seu máximo de produção, a qual foi desencadeada pela adição do LPS às células. Desta forma, os EICs já teriam sido liberados no meio de cultura, justificando, assim, a ausência destes mediadores após a adição do ionóforo de cálcio. Neste caso, temos a hipótese das células terem pouco AA em seus reservatórios, e assim menos produção de PGs. No entanto, na literatura são descritos dados opostos aos nossos, pois demonstraram aumento na produção de PGE₂ após estímulo de diferentes células com AA, na presença ou ausência de LPS (COETZEE et al., 2005; HIROSE et al., 2002; HUBBARD et al., 1993). Assim, outros estudos deverão ser realizados para investigar estas diferenças, e entender como a adição exógena de AA contribui para o aumento ou diminuição da produção de EICs.

Em conjunto, nossos dados sugerem que a molécula CD14 é fundamental para a ativação celular, por modular a produção de mediadores inflamatórios, como NO, TNF- α e

Discussão

IL-10, como também para a formação de CLs e produção de prostanoídes, como TXB₂ e PGE₂, por macrófagos inflamatórios, mas de modo independente do CD14 e do TLR4.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a molécula CD14 contribui para a formação de CLs e para a produção dos prostanoídes PGE_2 e TXB_2 , mas também é essencial para a síntese de mediadores inflamatórios como NO, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-10, principalmente quando os MDMOs foram estimulados com baixa concentração de LPS.

Referências¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023, NBR 6024, NBR 6027, NBR 6028, NBR 10520, NBR 1225 e NBR 14724.

- ADEREM, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. Supplement_2, p. S340-5, 15 jun. 2003.
- AKIRA, S.; HOSHINO, K. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187 Suppl 2, p. S356-363, 15 jun. 2003.
- ALMEIDA, P. E. et al. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1841, n. 1, p. 97–107, jan. 2014.
- ALVING, K.; MATRAN, R.; LUNDBERG, J. M. The possible role of prostaglandin D2 in the long-lasting airways vasodilatation induced by allergen in the sensitized pig. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 143, n. 1, p. 93–103, set. 1991.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 7 out. 2014.
- ARONOFF, D. M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 173, n. 1, p. 559–565, 1 jul. 2004.
- AUFFRAY, C. et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 317, n. 5838, p. 666–670, 3 ago. 2007.
- BAIN, C. C.; MOWAT, A. M. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 102–117, jul. 2014.
- BANDEIRA-MELO, C.; PHOOFULO, M.; WELLER, P. F. Extranuclear Lipid Bodies, Elicited by CCR3-mediated Signaling Pathways, Are the Sites of Chemokine-enhanced Leukotriene C4 Production in Eosinophils and Basophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22779–22787, 22 jun. 2001.
- BAUMANN, C. L. et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 12, p. 2689–2701, 22 nov. 2010.
- BAZIL, V. et al. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. **European Journal of Immunology**, v. 16, n. 12, p. 1583–1589, dez. 1986.
- BEIER, K.; VÖLKL, A.; FAHIMI, H. D. Suppression of peroxisomal lipid beta-oxidation enzymes of TNF-alpha. **FEBS letters**, v. 310, n. 3, p. 273–276, 5 out. 1992.
- BILLACK, B. Macrophage Activation: Role of Toll-like Receptors, Nitric Oxide, and Nuclear Factor kappa B. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 70, n. 5, 15 out. 2006.
- BORZECKA, K. et al. **CD14 Mediates Binding of High Doses of LPS but Is Dispensable for TNF- α Production.** Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/824919/>>. Acesso em: 15 jun. 2018.

- BOTTING, R. M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 57 Suppl 5, p. 113–124, nov. 2006.
- BOYETTE, L. B. et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0176460, 26 abr. 2017.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337–342, 15 maio 2003.
- BOZZA, P. T. et al. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 4, p. 1515–1525, 1 abr. 1996.
- BOZZA, P. T. et al. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 4, p. 563–569, out. 1998.
- BOZZA, P. T. et al. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 205–213, 1 nov. 2011.
- BOZZA, P. T.; MAGALHÃES, K. G.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1791, n. 6, p. 540–551, jun. 2009.
- BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30–49, 1 jan. 2007.
- BOZZA, P. T.; VIOLA, J. P. B. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4, p. 243–250, 1 abr. 2010.
- BRASH, A. R. Arachidonic acid as a bioactive molecule. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1339–1345, 1 jun. 2001.
- BURGMANN, H. et al. Increased Serum Concentration of Soluble CD14 Is a Prognostic Marker in Gram-Positive Sepsis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 80, n. 3, p. 307–310, 1 set. 1996.
- CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 48, n. 10, p. 445–453, 1 jan. 1994.
- CAVAILLON, J.-M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 413–424, set. 2011.
- CHANTEUX, H. et al. LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKs- and Sp1-dependent mechanisms. **Respiratory Research**, v. 8, n. 1, p. 71, 2007.

- CHAP, H. Forty five years with membrane phospholipids, phospholipases and lipid mediators: A historical perspective. **Biochimie**, v. 125, p. 234–249, 1 jun. 2016.
- CHÁVEZ-SÁNCHEZ, L. et al. The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 117, 14 out. 2010.
- CHOW, J. C. et al. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10689–10692, 16 abr. 1999.
- CIOFFI, D. L.; BARRY, C. J.; STEVENS, T. Role of Calcium as a Second Messenger in Signaling: A Focus on Endothelium. In: **Textbook of Pulmonary Vascular Disease**. [s.l.] Springer, Boston, MA, 2011. p. 261–272.
- COETZEE, M. et al. Stimulation of prostaglandin E2 (PGE2) production by arachidonic acid, oestrogen and parathyroid hormone in MG-63 and MC3T3-E1 osteoblast-like cells. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 73, n. 6, p. 423–430, dez. 2005.
- D'ANDREA, A. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 3, p. 1041–1048, 1 set. 1993.
- DAVIES, L. C. et al. Tissue-resident macrophages. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 986–995, out. 2013.
- D'AVILA, H. et al. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 176, n. 5, p. 3087–3097, 1 mar. 2006.
- DE ALMEIDA, P. E. et al. Lipid Bodies as Sites of Prostaglandin E2 Synthesis During Chagas Disease: Impact in the Parasite Escape Mechanism. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 20 mar. 2018.
- DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209–1220, 1 nov. 1991.
- DI GENNARO, A.; HAEGGSTRÖM, J. Z. Targeting leukotriene B4 in inflammation. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 18, n. 1, p. 79–93, jan. 2014.
- DIAZ, A. et al. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 241, n. 1, p. 222–229, 25 maio 1998.
- DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095–2147, 15 mar. 1996.
- DIXON, L. J. et al. Kupffer Cells in the Liver. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 785–797, abr. 2013.

Referências

- DOBROVOLSKAIA, M. A.; VOGEL, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, p. 903–914, 1 jul. 2002.
- DUBOIS, C.; BISSONNETTE, E.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. Platelet-activating factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages. Prevention by PAF receptor antagonists and lipoxygenase inhibitors. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 143, n. 3, p. 964–970, 1 ago. 1989.
- DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 12, p. 1063–1073, set. 1998.
- EBONG, S. J. et al. Critical Role of CD14 for Production of Proinflammatory Cytokines and Cytokine Inhibitors during Sepsis with Failure To Alter Morbidity or Mortality. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2099–2106, abr. 2001.
- ELASS, E. et al. Mycobacterial Lipomannan Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Macrophagic Cells through a Toll-Like Receptor 1 (TLR1)/TLR2- and CD14-Dependent Mechanism. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 7064–7068, 10 jan. 2005.
- ELLIS, E. F.; WEI, E. P.; KONTOS, H. A. Vasodilation of cat cerebral arterioles by prostaglandins D2, E2, G2, and I2. **The American Journal of Physiology**, v. 237, n. 3, p. H381–385, set. 1979.
- EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21–35, 17 jul. 2014.
- FALVO, J. V.; TSYTSYKOVA, A. V.; GOLDFELD, A. E. Transcriptional Control of the TNF Gene. **Current directions in autoimmunity**, v. 11, p. 27–60, 2010.
- FITZPATRICK, F. A.; SOBERMAN, R. Regulated formation of eicosanoids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1347–1351, 1 jun. 2001.
- FRANKEN, L.; SCHIWON, M.; KURTS, C. Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 475–487, abr. 2016.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 30 nov. 2001.
- GATTO, M. et al. The Involvement of TLR2 and TLR4 in Cytokine and Nitric Oxide Production in Visceral Leishmaniasis Patients before and after Treatment with Anti-Leishmanial Drugs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117977, 23 fev. 2015.
- GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5966, p. 656–661, 5 fev. 2010.
- GHALIB, H. W. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 1, p. 324–329, jul. 1993.

- GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p. 392–404, jun. 2014.
- GIOANNINI, T. L. et al. Monomeric endotoxin:protein complexes are essential for TLR4-dependent cell activation. **Journal of Endotoxin Research**, v. 11, n. 2, p. 117–123, 1 abr. 2005.
- GIOANNINI, T. L.; WEISS, J. P. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. **Immunologic Research**, v. 39, n. 1–3, p. 249–260, 2007.
- GONI, R.; GARCÍA, P.; FOISSAC, S. The qPCR data statistical analysis. p. 9, 2009.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan. 2003.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1 out. 1982.
- GUIJAS, C. et al. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 11, p. 2343–2354, nov. 2012.
- GUILLIAMS, M. et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 8, p. 571–578, ago. 2014.
- HAILMAN, E. et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 1, p. 269–277, 1 jan. 1994.
- HALDAR, M.; MURPHY, K. M. Origin, Development, and Homeostasis of Tissue-resident Macrophages. **Immunological reviews**, v. 262, n. 1, p. 25–35, nov. 2014.
- HAN, S. Y. et al. AKT-targeted anti-inflammatory activity of Panax ginseng calyx ethanolic extract. **Journal of Ginseng Research**, 23 jun. 2017.
- HARIZI, H.; CORCUFF, J.-B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 10, p. 461–469, out. 2008.
- HAZIOT, A. et al. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 141, n. 2, p. 547–552, 15 jul. 1988.
- HE, Z. et al. CD14 Is a Co-Receptor for TLR4 in the S100A9-Induced Pro-Inflammatory Response in Monocytes. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156377, 26 maio 2016.
- HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 869–876, fev. 2004.
- HIGGINS, D. M. et al. Lack of IL-10 alters inflammatory and immune responses during pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 89, n. 2, p. 149–157, mar. 2009.

- HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 29 dez. 2017.
- HIROSE, M. et al. Inhibition of proliferation of gastric epithelial cells by a cyclooxygenase 2 inhibitor, JTE522, is also mediated by a PGE2-independent pathway. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16 Suppl 2, p. 83–89, abr. 2002.
- HOAREAU, L. et al. Signaling pathways involved in LPS induced TNF α production in human adipocytes. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 7, p. 1, 8 jan. 2010.
- HOFFMAN, T. et al. Absence of modulation of monokine production via endogenous cyclooxygenase or 5-lipoxygenase metabolites: MK-886 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butylthio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), indomethacin, or arachidonate fail to alter immunoreactive interleukin-1 β , or TNF- α production by human monocytes in vitro. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 58, n. 3, p. 399–408, mar. 1991.
- HUANG, G.-J.; HUANG, S.-S.; DENG, J.-S. Anti-Inflammatory Activities of Inotilone from *Phellinus linteus* through the Inhibition of MMP-9, NF- κ B, and MAPK Activation In Vitro and In Vivo. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35922, 8 maio 2012.
- HUBBARD, N. E. et al. Effects of in vitro exposure to arachidonic acid on TNF- α production by murine peritoneal macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 54, n. 2, p. 105–110, ago. 1993.
- HUISING, M. O. et al. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 395–413, 3 maio 2004.
- HUSSELL, T.; BELL, T. J. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 2, p. 81–93, fev. 2014.
- JAKUBZICK, C. V.; RANDOLPH, G. J.; HENSON, P. M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. **Nature Reviews. Immunology**, v. 17, n. 6, p. 349–362, jun. 2017.
- JERSMANN, H. P. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 5, p. icb200562, 1 out. 2005.
- JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82–86, 1 jan. 1998.
- JONES, E. et al. Modulation of LPS stimulated NF- κ B mediated Nitric Oxide production by PKC ϵ and JAK2 in RAW macrophages. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 4, p. 23, 24 nov. 2007.
- KESSLER, B. et al. Interleukin 10 inhibits pro-inflammatory cytokine responses and killing of *Burkholderia pseudomallei*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42791, 20 2017.
- KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5082, p. 593–597, 23 out. 1992.

- KITA, Y. et al. Pathway-oriented profiling of lipid mediators in macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 330, n. 3, p. 898–906, 13 maio 2005.
- KIYOMIYA, K.; OH-ISHI, S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF1 alpha, thromboxane B2 and PGD2 in rat pleurisy induced by phorbol myristate acetate. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 201–206, out. 1985.
- KOMPRDA, T. et al. Arachidonic Acid and Long-Chain n–3 Polyunsaturated Fatty Acid Contents in Meat of Selected Poultry and Fish Species in Relation to Dietary Fat Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6804–6812, 1 ago. 2005.
- KUSUNOKI, T. et al. Serum levels of soluble CD14 in allergic inflammation. **Allergology International**, v. 47, n. 4, p. 271–278, 1 jan. 1998.
- LAVIN, Y. et al. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 12, p. 731–744, 25 nov. 2015.
- LEE, H.-K. et al. Double-Stranded RNA-Mediated TLR3 Activation Is Enhanced by CD14. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 153–163, 1 fev. 2006.
- LEE, W.-H. et al. Structural Basis for Low Catalytic Activity in Lys49 Phospholipases A2A Hypothesis: The Crystal Structure of Piratoxin II Complexed to Fatty Acid,. **Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 28–36, 1 jan. 2001.
- LESLIE, C. C. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 4, p. 373–376, 1 abr. 2004.
- LETURCQ, D. J. et al. Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 7, p. 1533–1538, 1 out. 1996.
- LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 4, p. 889–897, abr. 1984.
- LI, D. et al. Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. **Lipids**, v. 33, n. 4, p. 437–440, abr. 1998.
- LI, Y.-H. et al. Activation of macrophage nuclear factor- κ B and induction of inducible nitric oxide synthase by LPS. **Respiratory Research**, v. 3, n. 1, p. 23, 2002.
- LONNEMANN, G. et al. Cytokines in human renal interstitial fibrosis. I. Interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts. **Kidney International**, v. 47, n. 3, p. 837–844, mar. 1995.
- MACHADO, E. R. et al. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 175, n. 6, p. 3892–3899, 15 set. 2005.

- MACHADO, E. R. et al. Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of *Strongyloides venezuelensis* infection. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 59, n. 1, p. 18–32, 1 jun. 2010.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric Oxide and Macrophage Function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–350, 1997.
- MAINI, R. N. et al. Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) blockade in rheumatoid arthritis (RA). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 101, n. 2, p. 207–212, ago. 1995.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–185, jan. 2013.
- MANUKYAN MARIA et al. Binding of lipopeptide to CD14 induces physical proximity of CD14, TLR2 and TLR1. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 3, p. 911–921, 22 fev. 2005.
- MARCH, C. J. et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. **Nature**, v. 315, n. 6021, p. 641–647, 20 jun. 1985.
- MARIM, F. M. et al. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PLOS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15263, 17 dez. 2010.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231–12234, 15 jun. 1993.
- MARTIN, S. A.; BRASH, A. R.; MURPHY, R. C. The discovery and early structural studies of arachidonic acid. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 7, p. 1126–1132, 1 jul. 2016.
- MARTIN, S.; PARTON, R. G. Opinion: Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 373–378, maio 2006.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, 3 mar. 2014.
- MATTACKS, C. A.; POND, C. M. Interactions of noradrenalin and tumour necrosis factor alpha, interleukin 4 and interleukin 6 in the control of lipolysis from adipocytes around lymph nodes. **Cytokine**, v. 11, n. 5, p. 334–346, maio 1999.
- MAYA-MONTEIRO, C. M. et al. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 4, p. 2203–2210, 25 jan. 2008.
- MAYER-BARBER, K. D. et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. **Nature**, v. 511, n. 7507, p. 99–103, 3 jul. 2014.
- MCCALL, M. N. et al. On non-detects in qPCR data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 16, p. 2310–2316, 15 ago. 2014.
- MCGRATH, K. E.; PALIS, J. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 9, p. 1021–1028, set. 2005.

- MEDEIROS, A. I. et al. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1637–1644, mar. 2004.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.
- MELO, R. C. N. et al. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue & Cell**, v. 35, n. 1, p. 59–67, fev. 2003.
- MEMON, R. A. et al. Tumor necrosis factor mediates the effects of endotoxin on cholesterol and triglyceride metabolism in mice. **Endocrinology**, v. 132, n. 5, p. 2246–2253, maio 1993.
- MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 3–10, fev. 2007.
- MOLINA-HOLGADO, E. et al. Induction of COX-2 and PGE2 biosynthesis by IL-1 β is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 1, p. 152–159, set. 2000.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 30 dez. 1993.
- MOON, E.-Y.; PYO, S. Aflatoxin B1 inhibits CD14-mediated nitric oxide production in murine peritoneal macrophages. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 237–246, 1 mar. 2000.
- MOREIRA, L. S. et al. Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1791, n. 3, p. 156–165, 1 mar. 2009.
- MORESCO, E. M. Y.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current biology: CB**, v. 21, n. 13, p. R488-493, 12 jul. 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- NAKAO, S. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NFkappaB in human gingival fibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 238, n. 1–2, p. 11–18, set. 2002.
- NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion in Immunology**, v. 3, n. 1, p. 65–70, fev. 1991.
- NIHO, Y. et al. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. **Acta Haematologica**, v. 99, n. 3, p. 165–170, 1998.
- NONNENMACHER, Y.; HILLER, K. Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 12, p. 2093–2109, 2018.

- O'BANION, M. K. et al. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23261–23267, 5 dez. 1991.
- OKAMOTO, F. et al. Leukotriene B4 Augments and Restores FcγRs-dependent Phagocytosis in Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 52, p. 41113–41121, 24 dez. 2010.
- OMORI, K. et al. Multiple roles of the PGE2 -EP receptor signal in vascular permeability. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 21, p. 4879–4889, nov. 2014.
- O'NEILL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS letters**, v. 330, n. 2, p. 156–160, 13 set. 1993.
- O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453–460, 2013.
- ONOE, Y. et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 156, n. 2, p. 758–764, 15 jan. 1996.
- PACHECO, P. et al. Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation In Vivo: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6498–6506, 1 dez. 2002.
- PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 20, n. 2, p. 87–103, 2010.
- PARK, B. S.; LEE, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 12, p. e66, dez. 2013.
- PEREIRA, P. A. T. et al. Prostaglandins D2 and E2 have opposite effects on alveolar macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 2, p. 195–206, fev. 2018.
- PERERA, P. Y. et al. CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 9, p. 4422–4429, 1 maio 1997.
- PERES, C. M. et al. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 4, p. 483–489, 1 abr. 2007a.
- PERES, C. M. et al. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 179, n. 8, p. 5454–5461, 15 out. 2007b.
- POLTORAK, A. et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 11 dez. 1998.
- PRADO, M. K. B. et al. Leukotriene B4 is essential for lung host defence and alpha-defensin-1 production during *Achromobacter xylosoxidans* infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17658, 15 dez. 2017.

- PRICE, S. R.; OLIVECRONA, T.; PEKALA, P. H. Regulation of lipoprotein lipase synthesis by recombinant tumor necrosis factor--the primary regulatory role of the hormone in 3T3-L1 adipocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 251, n. 2, p. 738–746, dez. 1986.
- PUGIN, J. et al. CD14 is a pattern recognition receptor. **Immunity**, v. 1, n. 6, p. 509–516, set. 1994.
- RABY, A.-C. et al. Targeting the TLR Co-Receptor CD14 with TLR2-Derived Peptides Modulates Immune Responses to Pathogens. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 185, p. 185ra64-185ra64, 15 maio 2013.
- RAES, G. et al. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 3, p. 321–327, mar. 2005.
- RENZ, H. et al. Release of tumor necrosis factor- α from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2388–2393, 1 out. 1988.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.
- ROMANI, L. et al. Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 152, n. 7, p. 3514–3521, 1 abr. 1994.
- SAITO, S. et al. Important role of membrane-associated CD14 in the induction of IFN- β and subsequent nitric oxide production by murine macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 37–45, 1 jan. 2000.
- SARAIVA, M. et al. Identification of a Macrophage-Specific Chromatin Signature in the IL-10 Locus. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 2, p. 1041–1046, 15 jul. 2005.
- SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Including the Special Section: 11th European Symposium on Calcium. v. 1813, n. 5, p. 878–888, 1 maio 2011.
- SCHIMKE, J. et al. Anti-CD14 mAb treatment provides therapeutic benefit after in vivo exposure to endotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13875–13880, 11 out. 1998.
- SCOTT, K. F.; BRYANT, K. J.; BIDGOOD, M. J. Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A2-cyclooxygenase pathways in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, n. 4, p. 535–541, out. 1999.
- SECATTO, A. et al. 5-Lipoxygenase Deficiency Impairs Innate and Adaptive Immune Responses during Fungal Infection. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. e31701, 20 mar. 2012.
- SECATTO, A. et al. The Leukotriene B4/BLT1 Axis Is a Key Determinant in Susceptibility and Resistance to Histoplasmosis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85083, 21 jan. 2014.

- SEREZANI, C. H. et al. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 37, n. 5, p. 562–570, nov. 2007.
- SERHAN, C. N.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 17, p. 5335–5339, set. 1984.
- SHIVE, C. L. et al. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. **AIDS (London, England)**, v. 29, n. 10, p. 1263–1265, 19 jun. 2015.
- SIMMONS, D. L. et al. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 284–289, jan. 1989.
- SIROIS, J.; RICHARDS, J. S. Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 6382–6388, 25 mar. 1992.
- SOARES, E. M. et al. Leukotriene B4 enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 190, n. 4, p. 1614–1622, 15 fev. 2013.
- SORGI, C. A. et al. Histoplasma capsulatum Cell Wall β -Glucan Induces Lipid Body Formation through CD18, TLR2, and Dectin-1 Receptors: Correlation with Leukotriene B4 Generation and Role in HIV-1 Infection. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 7, p. 4025–4035, 1 abr. 2009.
- SORGI, C. A. et al. Dormant 5-lipoxygenase in inflammatory macrophages is triggered by exogenous arachidonic acid. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10981, 8 set. 2017.
- SPRANGERS, S.; DE VRIES, T. J.; EVERTS, V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.
- TABER, L.; CHIU, C. H.; WHELAN, J. Assessment of the arachidonic acid content in foods commonly consumed in the American diet. **Lipids**, v. 33, n. 12, p. 1151–1157, dez. 1998.
- TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. **Journal of Advanced Research**, Special Issue on Arachidonic Acid in Health and Disease. v. 11, p. 33–41, 1 maio 2018.
- TALPAIN, E. et al. Characterization of the PGE receptor subtype mediating inhibition of superoxide production in human neutrophils. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 7, p. 1459–1465, abr. 1995.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, out. 2014.
- TAUCHI-SATO, K. et al. The Surface of Lipid Droplets Is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507–44512, 15 nov. 2002.

- THOMAS, D. W. et al. Proinflammatory Actions of Thromboxane Receptors to Enhance Cellular Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6389–6395, 15 dez. 2003.
- THOMAS, G. et al. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 35, n. 6, p. 1306–1316, jun. 2015.
- TREFFKORN, L. et al. PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF-alpha, ET-1, IL-1alpha, IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 74, n. 1–4, p. 113–123, out. 2004.
- TROUPLIN, V. et al. Bone Marrow-derived Macrophage Production. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 81, 22 nov. 2013.
- TSYTSYKOVA, A. V.; GOLDFELD, A. E. Nuclear Factor of Activated T Cells Transcription Factor Nfatp Controls Superantigen-Induced Lethal Shock. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 4, p. 581–586, 21 ago. 2000.
- TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 1 nov. 2014.
- VAN DER BRUGGEN, T. et al. Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Human Monocytes Involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 Pathway. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3824–3829, ago. 1999.
- VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 643–675, 2015.
- WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. **Neuron Glia Biology**, v. 7, n. 1, p. 47–53, fev. 2011.
- WELLER, P. F. LEUKOCYTE LIPID BODIES — STRUCTURE AND FUNCTION AS “EICOSASOMES”. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 127, p. 328–340, 2016.
- WONG, K. L. et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 41–57, set. 2012.
- WRIGHT, S. D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science (New York, N.Y.)**, v. 249, n. 4975, p. 1431–1433, 21 set. 1990.
- WRIGHT, S. D. CD14 and innate recognition of bacteria. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 1, p. 6–8, 1 jul. 1995.
- YAEGASHI, Y. et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 234–238, 1 jan. 2005.
- YING, W. et al. Investigation of Macrophage Polarization Using Bone Marrow Derived Macrophages. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 76, 23 jun. 2013.

- YIU, G. K.; TOKER, A. NFAT Induces Breast Cancer Cell Invasion by Promoting the Induction of Cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12210–12217, 5 maio 2006.
- YOKOMIZO, T. Two distinct leukotriene B₄ receptors, BLT1 and BLT2. **Journal of Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 65–71, fev. 2015.
- ZANONI, I. et al. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 868–880, 11 nov. 2011.
- ZANONI, I. et al. CD14 and NFAT mediate lipopolysaccharide-induced skin edema formation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 5, p. 1747–1757, 1 maio 2012.
- ZANONI, I.; GRANUCCI, F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, 24 jul. 2013.
- ZHANG, H. H. et al. Tumor necrosis factor- α stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2929–2935, out. 2002.
- ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Current Protocols in Immunology**, v. Chapter 14, p. Unit 14.1, nov. 2008.
- ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74–e80, 21 out. 2010.
- ZOCCAL, K. F. et al. TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from *Tityus serrulatus* to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88174, 7 fev. 2014.
- ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB₄ and PGE₂ in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications**, v. 7, 23 fev. 2016.
- ZOCCAL, K. F. et al. CD36 Shunts Eicosanoid Metabolism to Repress CD14 Licensed Interleukin-1 β Release and Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 27 abr. 2018.

Anexos

ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do fenótipo e funcionalidade de neutrófilos recrutados em diferentes períodos após administração da peçonha de escorpião", registrada sob nº 16.1.782.60.0, sob a responsabilidade de Marcella Nicolini Furtado e Lucia Helena Faccioli, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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), foi aprovada na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP no dia 15/12/2016).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica					
Vigência da Autorização	02/01/2017 a 30/06/2018					
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. isogênico C57BL/6	Cam. isogênico 129sv	Cam. knockout 5LO +/-	Cam. Knockout: IFN- γ /-, IL-10 γ /-, TLR2 γ /-, TLR4 γ /-, CD14 γ /-	Cam. Knockout β 2-integrina γ /-	Cam. Knockout CD36 γ /-
Nº de animais	220	58	58	16 de cada (total: 80)	16	16
Peso/Idade	16-22g/ 6-8 sem.	16-22g/ 6-8 sem.	16-22g/ 6-8 sem.	16-22g/ 6-8 sem.	16-22g/ 6-8 sem.	16-22g/ 6-8 sem.
Sexo	Ambos	Ambos	Ambos	Ambos	Ambos	Ambos
Origem	Biot. Central USP RP	Biot. I da FCFRP	Biot. I da FCFRP	Biot. Animais especiais da FMRP	Biot. I da FCFRP	Biot. UNIFESP

Ribeirão Preto, 21 de dezembro de 2016.

Prof. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP