



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

ÍISIS FERRAZ LIBÓRIO TRZAN

**TRIAGEM DA CONTRIBUIÇÃO DE DIFERENTES ÓRGÃOS
PARA A PRODUÇÃO DE TNF E IL10 NA INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA**

SÃO PAULO

2023

ÍISIS FERRAZ LIBÓRIO TRZAN

**TRIAGEM DA CONTRIBUIÇÃO DE DIFERENTES ÓRGÃOS PARA A
PRODUÇÃO DE TNF E IL10 NA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2023

ÍISIS FERRAZ LIBÓRIO TRZAN

**TRIAGEM DA CONTRIBUIÇÃO DE DIFERENTES ÓRGÃOS PARA
A PRODUÇÃO DE TNF E IL10 NA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Alarcon Steiner.

Versão original.

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata:

Ísis Ferraz Libório Trzan

Título da Dissertação:

TRIAGEM DA CONTRIBUIÇÃO DE DIFERENTES ÓRGÃOS PARA A PRODUÇÃO DE TNF E IL10 NA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

Orientador:

Alexandre Alarcon Steiner

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

À minha família,
que tanto suportou
e sempre incentivou a minha educação.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à Deus, por guiar meus passos, e à minha família, que é minha estrutura e minha raiz. Aos meus pais, Rosane Ferraz e Carlos Libório, por todo o amor e proteção com que fui criada, por terem me transmitido valores aos quais permanecerei fiel aonde quer que eu vá, por sempre incentivarem meu gosto pelo estudo e por celebrarem cada pequena vitória minha. Aos meus irmãos, Gabriela e Victor, que fazem parte de mim, por estarem comigo nas situações mais difíceis e por nos apoiarmos em busca dos nossos sonhos. Vocês são a certeza de que nunca estarei só, amo e admiro cada um. A meu avô, Carlos Trzan, que, com o amor mais puro e benevolente, me deu o suporte para eu conseguir trilhar o caminho que escolhi. Vô, obrigada pelos ensinamentos e por me colocar um sorriso no rosto a cada ligação. A minha avó, Lucília Libório, figura ímpar, pela presença e amor na minha vida, pelas histórias e por me incentivar a seguir meus próprios passos. A minha avó Virgínia Ferraz (*in memoriam*), por ser um exemplo feminino que atravessa gerações, e pelo amor que teve por mim no pouco tempo que pudemos conviver. A Carlos, meu cunhado, por toda a força e apoio em tantos momentos. Aos meus tios e tias, em especial, tia Telma, pelo suporte durante os últimos anos.

Minha mais profunda gratidão ao meu orientador, Professor Dr. Alexandre Steiner. Primeiro, por ter aberto suas portas no curso de férias e ter visto potencial em mim para ser sua aluna. Segundo, por ter acreditado e confiado em mim para desenvolver esse projeto e por ter me dado a chance de fazer parte de sua equipe, sempre zelando pelo meu bem estar. Todos os ensinamentos, seja em relação às técnicas, à escrita, à ciência ou às situações da vida me fizeram crescer e amadurecer como profissional, cientista e ser humano.

A difícil tarefa de transformar uma recém graduada em mestranda foi confiada ao meu pós-doc e tutor, Dr. Eduardo Moretti, e a ele serei eternamente grata. Me ensinou tudo sobre o laboratório, do começo, com a maior paciência do mundo. Edu, obrigada pelos ensinamentos, ajuda, risadas, conselhos e conversas que desafiavam a minha capacidade argumentativa. Obrigada também por estar presente em todas as etapas do meu trabalho e por se preocupar genuinamente comigo.

Agradeço à minha primeira família em São Paulo, Ranieri e Sarah, por serem meu porto seguro, meu alívio cômico diário, meus conselheiros, por construírem um lar comigo e me fazerem sentir afeto e acolhimento no meio da selva de pedra.

Aos amigos que integraram minha família de SP: Luís Eduardo, que me abrigou quando eu mais precisei; João Vinícius, meu novo roomie, pelas risadas e pelo ombro amigo; Carol Prado, que me acolheu como vizinha e amiga assim que cheguei; e Victória Ribeiro, o pedacinho de Salvador que o destino colocou junto de mim.

Aos meus colegas de laboratório: Carol Martins, por toda a ajuda, companhia e caronas concedidas; Gabi Carvalho, por compartilhar das minhas raízes com sua alegria contagiante; Silvana, por todo o suporte nos experimentos e por nos alegrar com sua bagagem e histórias; Rayssa, pela ajuda no projeto, companhia e pela oportunidade de ensinar; Kathia, Manoela e Sandra, por serem sempre solícitas; e Monique Fonseca, pelos ensinamentos e conselhos enquanto estava no laboratório.

Obrigada também a todos os amigos que, em algum momento, foram importantes durante essa trajetória. Especialmente a Rayana Pombinho, com quem me confidencio, a Luana Maia, Nathália Peixoto e Lucas Chaves, que se fazem presentes na minha vida mesmo depois de tantos anos. A Ravi Nery, que em tão pouco tempo já foi capaz de me proporcionar tantos sorrisos e conversas sinceras. Também agradeço a Tiemi Akashi e a Pedro Lanza, com quem compartilhei tantos momentos marcantes, alegres e difíceis em SP.

Aos colegas e funcionários do departamento de Imunologia do ICB IV, principalmente à Eni, por todo o suporte e paciência comigo durante o mestrado, e ao professor Niels Olsen e seus alunos, por me acolherem sempre com carinho.

Aos membros da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Momtchilo Russo, Profa. Dra. Eliana Faquim e Profa. Dra. Caroline Munhoz, pelas críticas construtivas, considerações e sugestões ao meu trabalho durante o exame.

Aos professores do departamento de Imunologia, por todo o conhecimento transmitido, suporte e ajuda durante o projeto.

Aos demais professores, ao longo da vida, que me deram toda a base de conhecimento para chegar até aqui.

Agradecimento especial

Agradeço especialmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e auxílio concedido, com a qual foi possível a realização deste estudo.

“Somos assim. Sonhamos o voo, mas tememos as alturas.
Para voar é preciso amar o vazio. Porque o voo só acontece se houver o vazio.
O vazio é o espaço de liberdade, a ausência de certezas.
Os homens querem voar; mas temem o vazio. Não podem viver sem certezas.
Por isso, trocam o voo por gaiolas.
As gaiolas são o lugar onde as certezas moram.”

Rubem Alves, *Religião e Repressão*.

RESUMO

TRZAN, I. F. L. **Triagem da contribuição de diferentes órgãos para a produção de TNF e IL10 na inflamação sistêmica.** 2023. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A eficácia da resposta imune depende de um balanço entre fatores pró- e anti-inflamatórios, para que a infecção seja contida e os danos colaterais sejam minimizados. Esse balanço é, em parte, determinado pelo surgimento precoce da citocina pró-inflamatória TNF (Fator de Necrose Tumoral) e da citocina anti-inflamatória IL10 (Interleucina-10). O objetivo deste trabalho foi desvendar a contribuição relativa de diferentes órgãos para os níveis circulantes de TNF e IL10. Utilizamos o modelo de inflamação sistêmica induzida por LPS i.v. em ratos, determinando simultaneamente a concentração dessas citocinas no sangue e suas expressões no fígado, pulmão, rim, baço e intestino sob diferentes doses de LPS (10 a 5.000 µg/kg). Os níveis circulantes foram quantificados por ELISA e a expressão tecidual foi analisada por RT-qPCR. As concentrações plasmáticas de TNF e IL10 aumentaram gradualmente com a dose de LPS, sendo que a concentração de TNF alcançou um platô entre as doses de 1.000 µg/kg e 5.000 µg/kg. Entretanto, a expressão dessas citocinas não seguiu padrão dose-resposta semelhante em todos os órgãos, sugerindo que a contribuição relativa de cada órgão para o nível circulante dessas citocinas varia de forma dependente da dose de LPS. No fígado e no intestino, a expressão de *Tnf* apresentou um padrão semelhante ao TNF plasmático, aumentando progressivamente entre 10 e 1.000 µg/kg, e mantendo um platô até a dose mais alta. Apesar de um platô ter se formado para a expressão de *Tnf* nos rins, este foi atingido em uma dose de somente 10 µg/kg. No baço, a expressão de *Tnf* só foi elevada na dose de 5.000 µg/kg. O padrão de expressão nos pulmões foi mais complexo, caracterizado pela formação de um “vale” entre as doses de 100 e 5.000 µg/kg. Com relação à *Il10*, destaca-se o fato de que o intestino foi o órgão em que a expressão da citocina melhor correspondeu aos níveis plasmáticos, seguido do fígado. O pulmão apresentou uma queda na dose mais alta, perfil oposto aos níveis circulantes, enquanto baço só aumentou a expressão na dose de 5.000 µg/kg. Já nos rins, a expressão atingiu um platô na dose de 100 µg/kg. Em conjunto, esses resultados revelam que o fígado parece ser uma fonte relevante de TNF circulante, mas não de IL10. Já o intestino parece ser fonte considerável para os níveis circulantes de IL10, e pode também contribuir para os níveis plasmáticos de TNF nas doses testadas.

Palavras-chave: Inflamação sistêmica; LPS; TNF; IL10; Expressão gênica; Órgãos.

ABSTRACT

TRZAN, I. F. L. **Screening the contribution of different organs to TNF and IL10 production in systemic inflammation.** 2023. Dissertation (Master's degree in Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The effectiveness of the immune response depends on a balance between pro- and anti-inflammatory factors, so that the infection is contained and collateral damage is minimized. This balance is, in part, determined by the early appearance of the pro-inflammatory cytokine TNF (Tumor Necrosis Factor) and the anti-inflammatory cytokine IL10 (Interleukin-10). The aim of this work was to unravel the relative contribution of different organs to the circulating levels of TNF and IL10. We used the LPS-induced systemic inflammation model in rats, simultaneously determining the concentration of these cytokines in the blood and their expression in the liver, lung, kidney, spleen and intestine under different doses of LPS i.v. (10 to 5,000 µg/kg). Circulating levels were quantified by ELISA and tissue expression was analyzed by RT-qPCR. Plasma TNF and IL10 concentrations gradually increased with LPS dose, but TNF concentration reached a plateau between doses of 1.000 µg/kg and 5.000 µg/kg. However, the expression of these cytokines did not follow a similar dose-response pattern in all organs, suggesting that the relative contribution of each organ to the circulating level of these cytokines varies depending on the dose of LPS. In liver and intestine, *Tnf* expression showed a similar pattern to plasma TNF, progressively increasing between 10 and 1,000 µg/kg, and maintaining a plateau until the highest dose. Although a plateau formed for *Tnf* expression in the kidneys, this was reached at a dose of 10 µg/kg. In the spleen, *Tnf* expression was only elevated at a dose of 5,000 µg/kg. The expression pattern in the lungs was more complex, characterized by the formation of a “valley” between doses of 100 and 5,000 µg/kg. With regard to *Il10*, we highlight the fact that the intestine was the organ in which the expression of the cytokine best corresponded to plasmatic levels, followed by the liver. The lung showed a drop at the highest dose, the opposite profile to the circulating levels, while the spleen only increased the expression at the dose of 5,000 µg/kg. In the kidney, the expression reached a plateau at a dose of 100 µg/kg. Taken together, these results reveal that the liver appears to be a relevant source of circulating TNF, but not of IL10. The intestine seems to be a considerable source for circulating levels of IL10, and may also contribute to plasma levels of TNF at the doses tested.

Key words: Systemic inflammation; LPS; TNF; IL10; Gene expression; organs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da regulação da resposta imune

A resposta imunológica é regulada por mediadores secretados por leucócitos e outros fenótipos celulares, entre os quais destacam-se as citocinas, que são proteínas solúveis e secretadas no meio extracelular, capazes de se ligar a seus receptores celulares e induzir e/ou amplificar a resposta dos leucócitos frente a uma infecção ou traumas. Existem citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, ambas podendo agir de forma autócrina, parácrina ou endócrina.

As citocinas pró-inflamatórias são aquelas que recrutam células para o sítio de inflamação, induzem proliferação, diferenciação e ativação celular, estimulam a produção de mediadores não proteicos e de outras citocinas (Chaudhry et al., 2013). Entre as principais citocinas pró-inflamatórias estão o TNF, IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- γ .

Já as citocinas anti-inflamatórias suprimem a resposta inflamatória através de mecanismos como a ativação de células T regulatórias, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, redução da atividade de leucócitos, dentre outras funções. Outra importante ação das citocinas anti-inflamatórias está relacionada à reparação tecidual e resolução da inflamação. Exemplos dessas citocinas incluem principalmente a IL10, TGF- β e IL-1Ra. As citocinas anti-inflamatórias são essenciais no controle da resposta imune para minimizar os efeitos colaterais da inflamação (Varela et al., 2018).

A regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias é um processo controlado que estabelece a homeostase na maioria dos casos de infecção que acomete o organismo. Não obstante, certas patologias podem ser agravadas ou até causadas pelo desbalanço desses grupos de citocinas, e excesso ou insuficiência de fatores pró ou anti-inflamatórios são identificados em diversas condições clínicas como preditores de prognósticos (Fringuello et al., 2021; Lippitz, 2013; Wang et al., 2021) (**Figura 1**). **Sob essa ótica, muitos estudos vêm tentando elucidar a regulação de citocinas em nível celular, e o nosso laboratório iniciou uma linha de investigação para compreender, em níveis estruturais sistêmicos, como ocorre a regulação desses fatores pró e anti-inflamatórios entre os diferentes órgãos, mediante**

ativação da imunidade inata por PAMP. Seguiremos nessa linha durante o presente estudo.

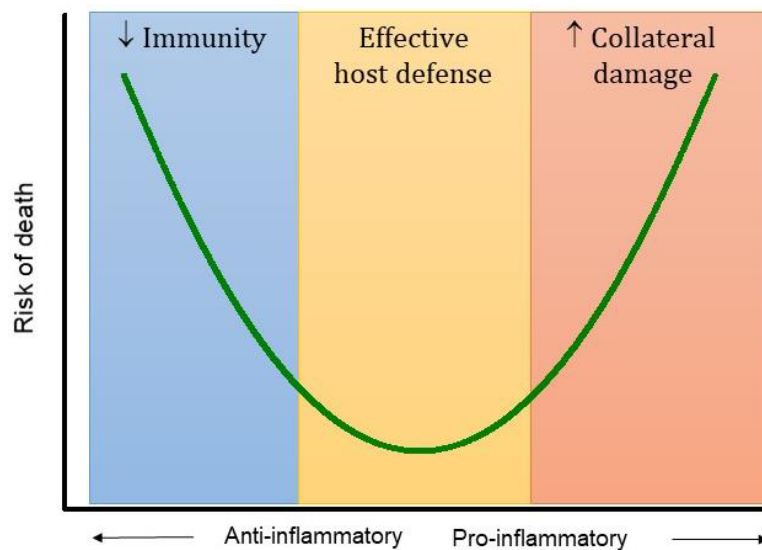


Figura 1. Regulação da resposta imune. O desequilíbrio de fatores pró e anti-inflamatórios pode causar riscos ao organismo. Adaptado de Steiner, A. A.

Como exemplo das consequências prejudiciais de uma ativação imune excessiva, podemos citar a sepse. A sepse é uma disfunção orgânica causada por uma resposta ineficaz do sistema imune do hospedeiro frente a uma infecção. É uma condição que oferece risco à vida do paciente, e que implica em alterações celulares e bioquímicas que levam à disfunção de diversos órgãos. Se agravada, essa condição pode resultar em choque séptico, no qual a disfunção cardiocirculatória eleva drasticamente a letalidade da síndrome (Singer et al., 2016). Apesar de os efeitos colaterais da resposta imune estarem fortemente presentes no caso da sepse, a inflamação é também crucial para combater a infecção inicial e garantir a sobrevivência do paciente. Diversos ensaios clínicos já tentaram tratar essa condição bloqueando citocinas pró-inflamatórias ou suprimindo a resposta imune, mas nenhuma terapia conseguiu, de fato, proporcionar uma melhora significativa no quadro (Abraham et al., 1995; Chousterman et al., 2017; Opal et al., 1997, 2014).

Por outro lado, seria plausível conjecturar que a ação de citocinas anti-inflamatórias seria bem-vinda no caso da sepse, uma vez que suprimir o quadro inflamatório poderia reduzir a injúria causada pelo sistema imune no próprio hospedeiro. Contrariamente a essa lógica, a sepse possui uma fase tardia em que o grande problema é a imunossupressão do paciente, com forte presença de citocinas anti-inflamatórias, que leva a uma condição de suscetibilidade a outras infecções após

o quadro de sepse ter sido resolvido (Hotchkiss et al., 2013). A dificuldade em encontrar uma abordagem terapêutica eficaz para essa condição nos mostra que a regulação da resposta imune é muito mais complexa em termos de interação entre fatores pró e anti-inflamatórios, curso do tempo e amplitude do dano, do que apenas um desequilíbrio que favorece um lado ou outro da resposta imune.

Outra condição patológica que envolve os danos causados pela inflamação é a COVID-19, doença causada pelo vírus Sars-Cov-2, que rapidamente se espalhou pelo mundo em 2020 e acarretou na pandemia que causou a morte de milhões de pessoas recentemente. Por ter sido amplamente estudada nos últimos 3 anos, já se sabe que a COVID grave se desenvolve acompanhada de uma “tempestade de citocinas”, que acontece nos indivíduos com algumas características genéticas, fenotípicas e/ou sociais que favorecem uma ativação imune robusta, se assemelhando a um quadro de sepse (Darif et al., 2021; B. Liu et al., 2020). Em contrapartida, diversos estudos já mostraram que nos casos mais graves e com piores desfechos, há uma elevada quantidade de IL10 circulante concomitante com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (H. Han et al., 2020; Islam et al., 2021). *Henry, B. M. et al.* (Henry et al., 2021) identificaram, numa coorte de 52 pacientes com COVID-19, que as concentrações de IL10 plasmáticas foram mais preditoras de mau prognóstico do que a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6. Visto isso, fica claro que a fisiopatologia de doenças que classicamente estão associadas com a resposta pró-inflamatória, como a sepse e a COVID, também é fortemente dependente dos níveis circulantes das citocinas anti-inflamatórias, mais especificamente da IL10.

Diante disso, a complexidade da interação do sistema imune e de seus fatores pró e anti-inflamatórios é um obstáculo para o entendimento aprofundado de quadros clínicos que não possuem um tratamento eficaz e direcionado nos dias atuais.

1.2 Citocinas centrais para o equilíbrio inflamatório

A partir do início do processo de infecção ou injúria, uma série de alterações metabólicas e transcricionais ocorre nas células do sistema imune inato e em outras células presentes no tecido infectado. No caso da entrada de um patógeno, os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como RNA de vírus, Lipopolissacarídeos (LPS) de bactéria Gram-negativa, Ácido lipoteicoico de bactérias

Gram-positivas, manana e glucana da parede celular de fungos, se ligam a Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs) de membrana, receptores do tipo NOD (NLRs) citosólicos, receptores do tipo RIG (RLR), e os sensores de DNA, e ativam cascatas de sinalização que induzem a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em macrófagos residentes do tecido, células dendríticas (DC) e células endoteliais. Além dos PAMPs, os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), como ATP, Ácido úrico e HMGB1, também são importantes para a ativação da imunidade inata (Abbas et al., 2019; Varela et al., 2018) (**Figura 2**).

Um dos principais tipos de receptores de padrões são os TLRs, e comumente se utiliza lipopolissacarídeo (LPS) como indutor de inflamação sistêmica em modelos animais porque o LPS é uma endotoxina de bactérias Gram-negativas que se liga no TLR4 e ativa a cascata inflamatória (**Figura 2**). **Nesses modelos, a citocina pró-inflamatória TNF é a primeira a ser detectável no plasma e dela depende o curso da resposta imune inata** (Erickson & Banks, 2011). Essa produção e liberação rápida de citocinas é essencial para o recrutamento de neutrófilos e de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (Abbas et al., 2019; Tang et al., 2012; Varela et al., 2018), entretanto, o excesso de TNF pode gerar danos ao organismo e está associado com diversas patologias (Chaudhry et al., 2013).

Com o início da resposta pró-inflamatória, a resposta anti-inflamatória começa a ser induzida simultaneamente, ainda que em menor escala, para que não haja uma super ativação do sistema imune com conseqüente danos graves ao organismo. A Interleucina 10 (IL10) é a citocina primordial nesse processo de equilíbrio que se estabelece logo nas primeiras horas de infecção. Assim, apesar da resposta anti-inflamatória estar fortemente relacionada com o processo de reparação e controle do final da resposta imune, ela também aparece de forma importante no primeiro momento para controlar a inflamação que se inicia (Colson et al., 2003). **Além de outros fatores que serão descritos a seguir, tanto TNF quanto IL10 são citocinas essenciais para a resposta inflamatória porque são prontamente produzidas e desencadeiam uma série de sinalizações que são determinantes na condução da resposta inata** (Chaudhry et al., 2013). **Nessa perspectiva, utilizamos essas duas citocinas como parâmetros centrais do balanço inflamatório nesse trabalho.**

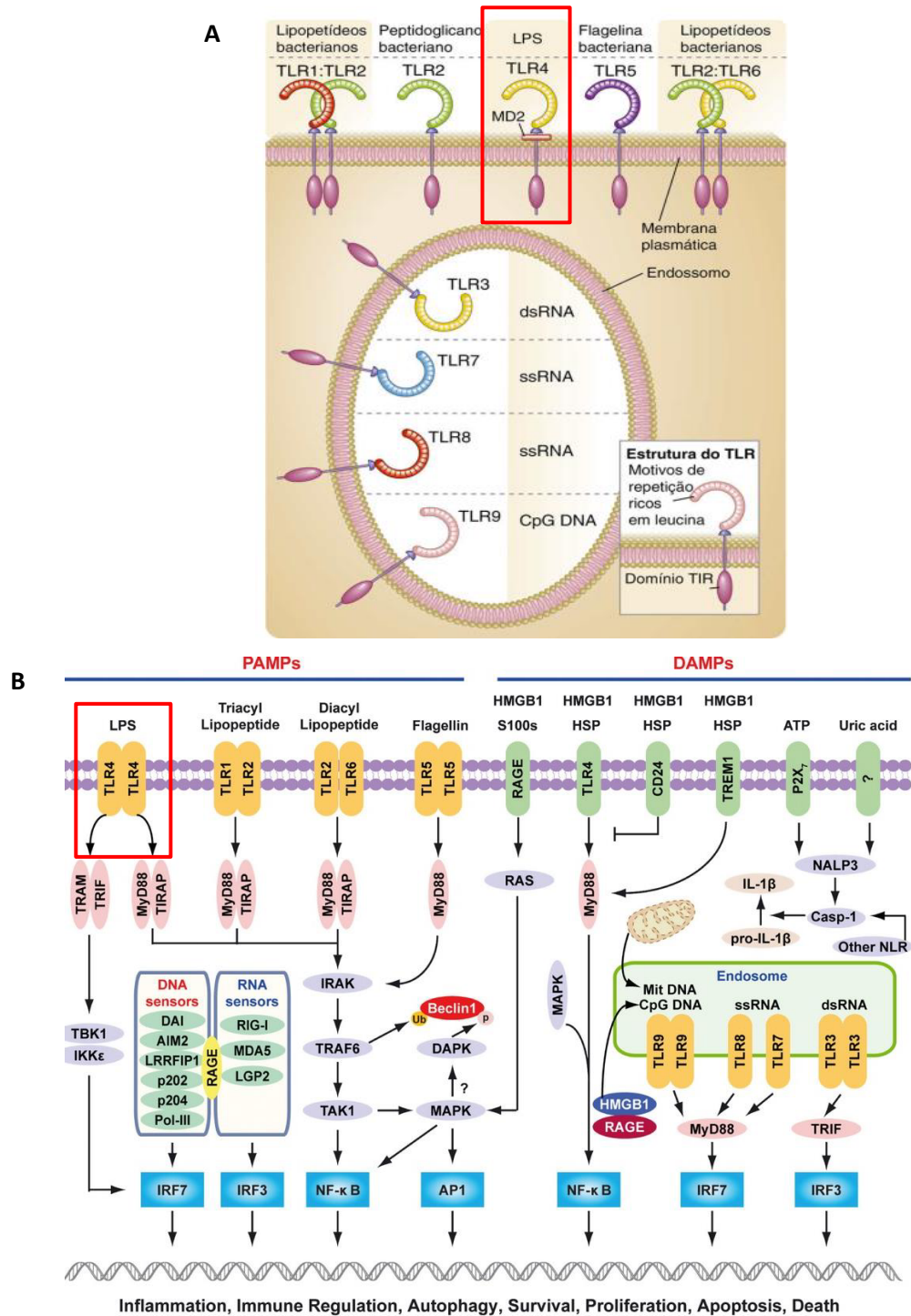


Figura 2. Receptores e vias de sinalização envolvidos na resposta ao Lipopolissacarídeo. A, principais tipos de TLR e seus respectivos ligantes (TLR4, que reconhece LPS, enfatizado pelo quadrado vermelho). Adaptado de Abbas et al., 2019. B, cascatas de sinalizações induzidas por PAMPs e DAMPs (TLR4 e suas vias de ativação enfatizado pelo quadrado vermelho). Adaptado de Tang et al., 2012.

1.2.1 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O Fator de Necrose Tumoral é uma citocina pleiotrópica pró-inflamatória que vem sendo estudada há mais de 40 anos, devido ao seu papel essencial na ativação, proliferação, diferenciação e apoptose de leucócitos, assim como sua participação na patogênese de diversas doenças (Aggarwal et al., 2012).

A história de sua descoberta perpassa por experimentos controversos (Balkwill, 2009), como o do pesquisador William Coley, que na década de 1890 tratou pacientes oncológicos com bactérias e depois com endotoxinas (*Coley's mixed toxins*) (Coley, 1891, 1910), e obteve êxito com a resposta rápida e prolongada dos pacientes. Poucos grupos conseguiram reproduzir esses resultados, e após alguns anos, o grupo de pesquisa de O'Malley (O'Malley et al., 1988) retirou o soro de animais tratados com LPS e injetou em animais com câncer, e como o soro também foi capaz de causar a necrose do tumor, foi sugerido que o soro continha um fator necrosante de tumor. Finalmente, em 1975, Carswell et. al (Carswell et al., 1975) demonstraram que a necrose do tumor era causado por uma substância liberada pelas células do hospedeiro em resposta à endotoxina, e cunhou o termo "*Tumour Necrosis Factor*" (Fator de Necrose Tumoral) para descrever sua atividade, reportadamente produzida por macrófagos. Já em 1982, Kawakami et. al. (Kawakami et al., 1982) publicaram que uma substância produzida por macrófagos de animais tratados com endotoxina secretava uma substância capaz de induzir caquexia por suprimir a lipoproteína lipase, e por isso foi denominada caquectina. Pouco tempo depois, em 1985, após o sequenciamento de DNA, foi identificado que caquectina e TNF se tratavam da mesma citocina (Beutler et al., 1985).

Juntamente com IL-1 β , o TNF é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias a serem detectadas no plasma em modelos de inflamação induzida por LPS, com seu pico inicial em torno de 2h após o insulto inflamatório, e já sendo detectado no plasma dentro da primeira hora após o estímulo (Colson et al., 2003) (**Figura 3**).

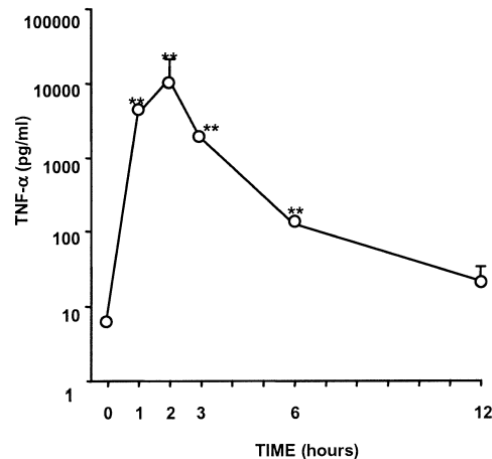


Figura 3. Cinética do TNF após LPS. O TNF começa a ser detectado na corrente sanguínea poucos minutos após a exposição ao LPS, e atinge seu pico entre 60 a 120 minutos. Cinética realizada em experimento com ratos, na dose de 7,5 mg/Kg de LPS i.p.. Reproduzida de Colson et al., 2003.

Essa citocina é expressa de duas formas distintas: como proteína transmembrana precursora e como molécula solúvel secretada. A forma precursora é um polipeptídeo composto por 233 resíduos de aminoácidos (26 kDa) ancorada na membrana por um domínio transmembrana. Em resposta a endotoxinas e outros estímulos, essa proteína é então clivada por metaloproteínases como a TACE (do inglês, *TNF-converting enzyme*), e a forma solúvel com 157 resíduos de aminoácidos (17 kDa) é então liberada. A ligação não covalente de três monômeros de 17 kDa gera a conformação bioativa de TNF solúvel, que é a forma predominante no sangue e outros tecidos (Chen & Goeddel, 2002; Tracey & Cerami, 1994). Tanto a forma transmembrana quanto a proteína solúvel são funcionais quando se ligam aos seus receptores (Horiuchi et al., 2010). O gene codificador do *Tnf* está localizado no cromossomo 6 em humanos, no cromossomo 20 em ratos da espécie *Rattus norvegicus* e no cromossomo 17 em camundongos *Mus musculus* (NCBI. National Library of Medicine).

A produção de TNF nos macrófagos é induzida pela ligação dos PRRs com PAMPs ou DAMPs. O principal PAMP utilizado para indução de inflamação sistêmica em modelos animais é o LPS de bactéria, o qual se liga no complexo receptor TLR4-MD-2 com a ajuda das moléculas acessórias LBP (proteína de ligação ao LPS) e CD14 (Park & Lee, 2013) (**Figura 4**). A ligação e ativação desses receptores induzem sinalizações intracelulares que culminam na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, que irá induzir a transcrição do gene codificador do *Tnf* (Lu et al., 2008)

(Figura 4). Outros mediadores como IFN, IL-1, IL-2, GM-CSF e o próprio TNF também podem estimular a produção de TNF (Horiuchi et al., 2010).

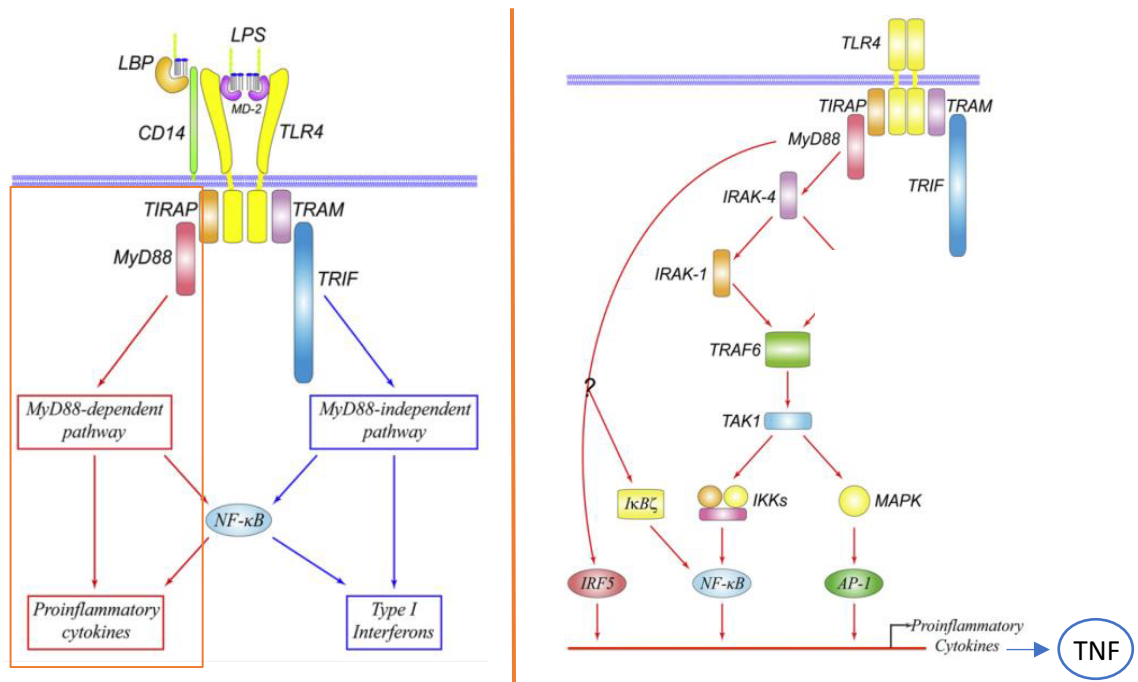


Figura 4. Via de sinalização intracelular ativada pelo complexo TLR4-MD-2 que culmina na produção de TNF. A ligação do LPS com o complexo TLR4-MD-2 ativa a porção citoplasmática da proteína, que possui motivos TIR capazes de recrutar proteínas adaptadoras como MyD88. Essa última, por sua vez, ativa uma cascata de sinalizações que culminam na ativação do fator de transcrição NF-κB, que induz a transcrição do gene *Tnf*. Adaptado de Lu et al., 2008.

Uma vez que o TNF é transcrito, traduzido e secretado na sua forma bioativa pelo macrófago estimulado, ele pode se ligar em 2 tipos de receptores celulares: TNF-RI (CD120a) e TNF-RII (CD120b). Como o TNF é um homotrímero em formato piramidal, cada molécula consegue se ligar em 3 receptores na mesma célula, e os dois tipos de receptores são expressos também na forma trimérica (Balkwill, 2009). TNF-RI é expresso na maioria dos tipos celulares, e possui domínio de morte associado aos receptores de TNF (TRADD), assim como fatores associados aos receptores de TNF (TRAF), moléculas que conseguem ativar vias distintas que culminam na apoptose da célula ou na produção de citocinas pró-inflamatórias, respectivamente. Já o TNF-R2 é restrito a alguns tipos celulares, tais como células mieloides, subtipos de linfócitos T e B, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e também em algumas linhagens de células tumorais; quando ativado por seu ligante, recruta TRAFs no seu domínio citoplasmático, mas não recruta TRADD e não induz via apoptótica (Zelová & Hošek, 2013). Ambos os tipos de receptores desencadeiam vias de sinalização que ativam fatores de transcrição NF-κB e AP-1, que induzem a expressão de citocinas pró-

inflamatórias como o próprio TNF, IL-1 β e IL-6. A morte celular é uma resposta tardia ao TNF mediada pelo receptor do tipo I (Balkwill, 2009) (**Figura 5**).

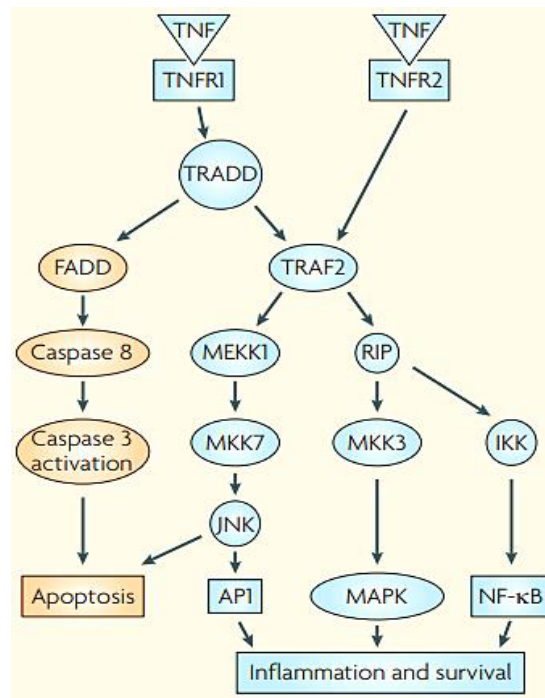


Figura 5. Vias de sinalização downstream da ativação dos receptores TNF-RI e TNF-II. Ambos os tipos de receptores desencadeiam vias de sinalização que ativam fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, que induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e fatores de sobrevivência. A morte celular é uma resposta tardia ao TNF mediada pelo receptor do tipo I. Reproduzida de Balkwill, 2009.

Como os receptores de TNF estão presentes na maioria dos tecidos, essa citocina consegue ter uma ação disseminada no organismo, com múltiplos alvos celulares. Tendo em face as múltiplas funções pró-inflamatórias do TNF, essa citocina precisa ser produzida de forma estritamente controlada, uma vez que ela também possui diversos efeitos colaterais danosos ao hospedeiro (Chaudhry et al., 2013). Diversos estudos demonstraram a participação do TNF na patogênese de doenças que envolvem a ativação excessiva do sistema imune, e, diante disso, a terapia com anticorpos neutralizantes anti-TNF vem sendo utilizadas e bem sucedidas em uma parcela significativa de pacientes com artrite reumatoide (Bathon et al., 2000; Lipsky et al., 2000; Murray & Dahl, 1997; Weinblatt et al., 2003), psoríase (Mease et al., 2000) e doença de Crohn (Louis et al., 2002).

1.2.2 Interleucina 10 (IL10)

A IL10 é uma citocina anti-inflamatória que possui papel central na regulação imune por antagonizar a resposta pró-inflamatória através de uma rápida expressão que acompanha a produção das citocinas inflamatórias desde o início da infecção (Ouyang et al., 2011).

Quando descoberta, há 34 anos, a IL10 foi inicialmente chamada de fator inibidor da síntese de citocinas secretadas (CSIF), produzido por células Th2 que inibia a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células Th1 (Fiorentino et al., 1989). Posteriormente, foi revelado que esse mecanismo é mediado pela ação da IL10 na função do macrófago como célula apresentadora de antígeno, reduzindo a produção de IL-12 e, conseqüentemente, a diferenciação das Th1 e secreção de TNF, IFN- γ e IL-2 por esse subtipo de linfócito T (Fiorentino et al., 1991). Após o sequenciamento e descrição da citocina, várias outras funções da IL10 foram sendo descobertas, e ela se estabeleceu como uma citocina central na imunorregulação e também na participação de diversos processos fisiológicos (Saraiva et al., 2020).

Nesse contexto de imunorregulação, a IL10 possui dois picos de produção na cinética da resposta imune: o primeiro aparece junto com a produção de TNF no início da resposta, e o segundo ocorre cerca de 30 horas após o estímulo inflamatório, é mais duradouro e importante para a fase de resolução da inflamação (Erickson & Banks, 2011) (**Figura 6**).

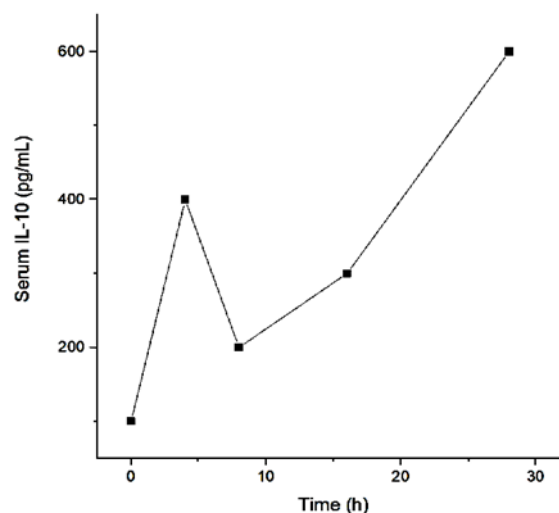


Figura 6. Cinética da IL10 após administração de LPS. A IL10 possui um comportamento bifásico, com 2 picos de produção ao longo da resposta imune. Começa a ser produzida logo após a exposição ao LPS, e atinge seu primeiro pico após 5 horas. O segundo aumento significativo aparece por volta de 30 horas após a exposição. Cinética realizada em experimento com camundongos, na dose de 3 mg/Kg de LPS i.p.. Adaptado de *Erickson & Banks, 2011*.

A IL10 é uma proteína composta por 160 resíduos de aminoácidos (18,5 kDa), que forma um homodímero (37 kDa) ligado não-covalentemente em sua forma bioativa. Ela foi a primeira a ser descrita da família de citocinas IL10, que abrange também as citocinas IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26. A proteína IL10 é categorizada de forma única em sua família por ter uma função central de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN- γ e IL-1 β (Walter, 2014). Ela atua em seus alvos celulares através de 2 receptores: IL10R1 e IL10R2. Ambos são receptores heterodiméricos, de estrutura e tamanho semelhantes, compostos por domínio intracelular, hélice transmembrana e domínio de ligação extracelular. Enquanto o domínio extracelular de IL10R1 forma uma interação de alta afinidade com IL10, o domínio de IL10R2 se liga com baixa afinidade, e tais receptores participam, junto com os receptores de Interferon, do complexo de receptores de citocinas de classe II, os quais são agrupados pelas posições conservadas de cisteínas em suas sequências (Donnelly et al., 2004).

A produção celular da IL10 no sistema imune inato é estimulada quando PAMPs são reconhecidos por PRRs e ativam as vias de sinalização necessárias para a produção de diversas citocinas. Os principais receptores associados com a indução da expressão de IL10 em APCs são TLR2, TLR4 e TLR9; não coincidentemente os mesmos que são recrutados para a indução de citocinas pró-inflamatórias já citadas anteriormente. A sinalização de TLR via MYD88 ativa a cascata de ativação de MAPKs e NF- κ B, fator de transcrição que conduz a expressão de *Il10* junto com outras citocinas pró-inflamatórias como *Tnf* (**Figura 7**). Outros estímulos que aumentam a produção dessa citocina em macrófagos e células dendríticas (DCs) envolvem a sinalização por Interferons do tipo I (Saraiva & O'Garra, 2010). O gene da *Il10* se localiza no cromossomo 1 de humanos e de camundongos *Mus musculus*, e no cromossomo 13 em ratos da espécie *Rattus norvegicus* (NCBI. National Library of Medicine).

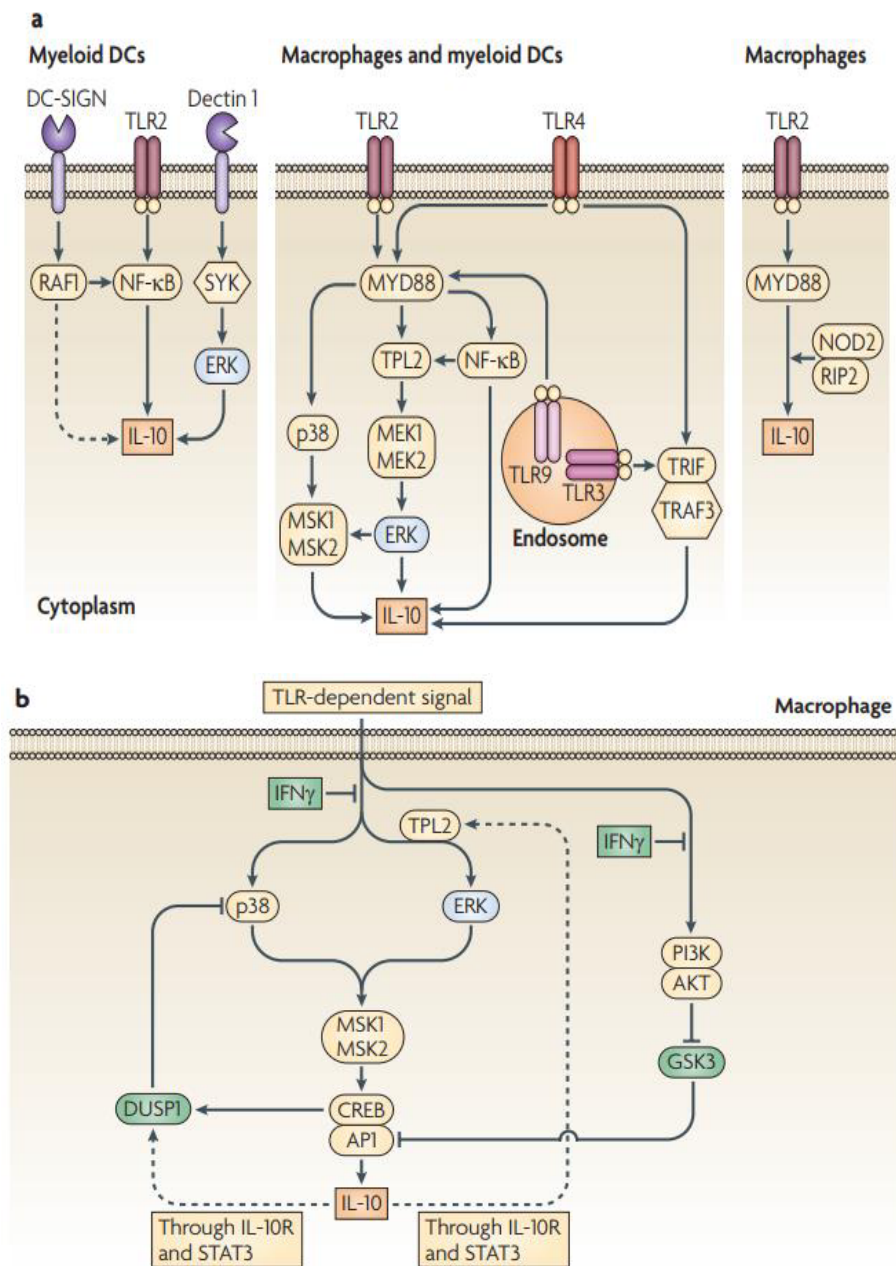


Figura 7. Vias de sinalização de TLR que induzem a expressão de IL10 nas APCs. a, a ativação de diferentes TLRs e suas moléculas adaptadoras (MYD88 e TRIF) ativam vias de sinalização que culminam na produção de IL10. **b,** feedbacks positivos e negativos que regulam a produção de IL10 em macrófagos. A IL10 pode induzir uma alça de retroalimentação positiva através da via do TPL2, ou pode induzir um feedback negativo através da via DUSP1. Além disso, IFN- γ também regula negativamente a produção de IL10. Reproduzido de *Saraiva & O'Garra, 2010*.

Uma vez expressa, secretada e ligada ao seu receptor específico, a IL10 desencadeia uma série de sinalizações intracelulares, ativando as vias Jak/STAT, principalmente o fator de transcrição STAT3 (Ouyang et al., 2011) (**Figura 8**). *Takeda et al.* (Takeda et al., 1999) mostraram que macrófagos e neutrófilos com depleção de

STAT3 anularam os efeitos anti-inflamatórios da IL10, apontando a importância dessa via para a ação da citocina.

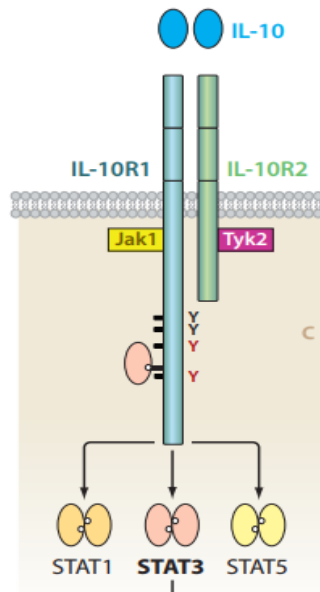


Figura 8. Via de sinalização da IL10 culminando na ativação de STATs. A cascata de sinalização ativada por IL10 envolve, principalmente, a ativação do fator de transcrição STAT3. Adaptado de Saraiva & O'Garra, 2010.

Os principais eventos que sucedem a sinalização da IL10 envolvem a supressão da via NF- κ B ativação das proteínas inibitórias SOCS3, competição com vias intracelulares pró-inflamatórias, indução da produção de antagonistas naturais como IL-1RA e TNFRs solúveis, além da inibição da produção de quimiocinas e de receptores celulares de IL-1 (Moore et al., 2001). Em conjunto, essa sinalização garante um efeito anti-inflamatório central na imunidade inata, o qual é descrito por Kühn et al. (Kühn et al., 1993) em estudo com camundongos deficientes em IL10, que desenvolveram doença inflamatória intestinal devido a uma resposta exacerbada a peptídeos microbianos da microbiota.

Nas células apresentadoras, a IL10 suprime a atividade de APCs inibindo a produção de IL-12, das moléculas apresentadoras de antígenos MHCII e das quimiocinas que participam da migração de DC (Mege et al., 2006).

Embora a IL10 seja essencial no controle da resposta imune, essa citocina também apresenta outra faceta que se relaciona com diversas situações patológicas. Altos níveis de IL10 circulante estão associados com maior suscetibilidade a patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* e *Leishmania spp*, e a bactérias extracelulares como *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomona aeruginosa* em modelos animais, e associados com maior persistência microbiana em seres humanos

(Greenberger et al., 1995; van der Poll et al., 1996). Em outras patologias como a malária e a sepse, contudo, a relação da IL10 circulante com o desfecho da doença sugere uma grande variabilidade entre o tipo de patógeno, a carga microbiana, dentre outros fatores, e a correlação com os níveis circulantes da citocina. **Essa divergência entre os estudos sugere que, talvez, a polarização da resposta imune e a associação do IL10 com outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF, seja mais relevante do que apenas a imunorregulação da IL10 em si** (Mege et al., 2006).

1.3 Células produtoras de TNF e IL10

A produção de TNF em células do sistema imune inato ocorre principalmente em macrófagos ativados por PAMPs e DAMPs. Estudos mostraram que a depleção sistêmica de macrófagos por lipossomas contendo clodronato (fármaco capaz de induzir apoptose seletiva após ser fagocitado em alta quantidade por macrófagos) foi capaz de reduzir, em cerca de 50-75%, os níveis de RNAm de *Tnf* no fígado e cerca de 80% do TNF quantificado em lavado pulmonar, indicando os macrófagos como principal fonte de TNF nesses órgãos (Filliol et al., 2017; Koay et al., 2002; Salkowski et al., 1995).

Apesar de os macrófagos serem convencionalmente classificados em M1 e M2, sendo M1 o fenótipo pró-inflamatório e M2 o anti-inflamatório, convém ressaltar que existem “tons de cinza” entre os dois extremos, e o perfil fenotípico dessas células são suscetíveis aos estímulos do ambiente (Mosser & Edwards, 2008). *Komegae et al.* (Komegae et al., 2019) identificaram que macrófagos de ratos obesos estimulados com LPS secretaram TNF e IL10 em proporções distintas para cada órgão avaliado, mesmo que todos os macrófagos exibissem um perfil de citocinas do tipo M1. Ainda nesse estudo, foi visto que a condição de obesidade alterou a razão TNF/IL10 de formas diferentes nos subgrupos de macrófagos estudados, mostrando que, a depender de cada órgão, o mesmo estímulo inflamatório induz uma mudança para um espectro mais ou menos pró-inflamatório dessas células.

Os macrófagos que se polarizam no perfil mais pró-inflamatório M1 são os grandes produtores de TNF, devido à sinalização por TLR e também à alça de amplificação dos próprios receptores TNFRs, que induzem a síntese de mais TNF. Macrófagos residentes que são importantes produtores de TNF incluem Células de Kupffer (fígado) e macrófagos alveolares (pulmão) (Tracey & Cerami, 1994).

Como os neutrófilos são os primeiros leucócitos a migrarem para o local de infecção (Phillipson & Kubers, 2011), é válido considerar a importância que essas células podem ter para o pico de TNF circulante no início da inflamação sistêmica. Alguns estudos mostraram que, em modelos de inflamação por LPS e infecção em animais com neutropenia, os níveis de TNF no plasma aumentam de forma significativa (Hewett et al., 1993; Steinshamn & Waage, 1992). *Daley et al.* (Daley et al., 2005) mostraram que a neutropenia em camundongos desafiados com LPS desencadeou não apenas o aumento do TNF plasmático, mas também do transcrito de RNAm no fígado e no baço, sugerindo que o neutrófilo possivelmente participa de algum mecanismo de feedback negativo que regula a produção de TNF nos órgãos.

Em relação à produção de IL10 na inflamação aguda, neutrófilos, APCs, células B1 e linfócitos Treg aparecem como fontes celulares importantes dessa citocina (Barbeiro, 2009; Bronte, 2009; Brudecki et al., 2012; Lewkowicz et al., 2016; Okeke & Uzonna, 2019; Popi et al., 2004; Z. Zhang et al., 2021), sendo macrófagos e DCs as principais apresentadoras produtoras de IL10 (Mege et al., 2006). As mesmas células produtoras também representam um dos principais alvos da citocina, alimentando uma alça de feedback positivo que, por sua vez, promovem a supressão de TNF (e outras citocinas pró-inflamatórias) em macrófagos (**Figura 9**).

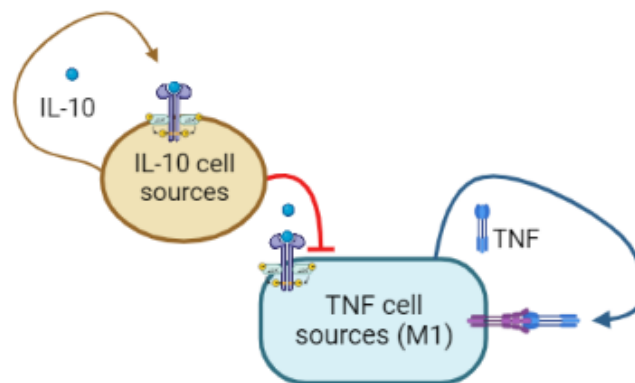


Figura 9. Esquema de retroalimentação das células secretoras de IL10 e TNF. As células secretoras de IL10 e TNF possuem receptores para as mesmas citocinas que produzem. Esses receptores, por sua vez, estimulam a produção de mais citocinas. Além disso, esses dois tipos celulares interagem entre si, uma vez que a IL10 é capaz de suprimir a secreção de TNF. Figura produzida pela autora com *BioRender*.

Apesar de neutrófilos serem classicamente associados com a resposta pró-inflamatória, diversos estudos vêm mostrando que alguns subtipos dessa célula, em murinos e humanos, também são fonte de IL10 no contexto inflamatório (Bouabe et al., 2011; Ocuin et al., 2010; Pillay et al., 2012; X. Zhang et al., 2009). Em

experimentos *in vitro*, Lewkowicz *et al.* (Lewkowicz *et al.*, 2016) mostraram que neutrófilos aumentam significativamente a produção de IL10 quando entram contato célula-célula com Treg previamente estimuladas por LPS. Uma vez que os neutrófilos entram em feedback positivo com a secreção de IL10, isso pode indicar como poucas Treg conseguem induzir uma população significativamente maior de neutrófilos produtores de IL10.

Uma linhagem imatura de neutrófilos e monócitos, as MDSC (*myeloid derived suppressor cell*), tem sido amplamente investigada pela sua capacidade de suprimir outras células do sistema imune inato através da secreção de IL10 (Bronte, 2009). Contudo, Brudecki *et al.* (Brudecki *et al.*, 2012) identificaram que essas células teriam um papel mais pró-inflamatório na inflamação sistêmica inicial e mudariam para um perfil anti-inflamatório na fase tardia, com uma produção mais relevante de IL10 no segundo momento, em modelo de sepse induzida por CLP em camundongos.

Células B-1, que apresentam marcadores de linhagem mieloide e se localizam no peritônio (capazes de migrar para outros sítios de infecção), também despontam como uma fonte celular importante na produção primária de IL10. Popi *et al.* (Popi *et al.*, 2004) observaram que macrófagos peritoneais de camundongos WT (*Wild Type*) produziram maiores quantidades de IL10 *in vitro* quando comparadas a culturas de macrófagos obtidos de camundongos Xid (que não possuem células B-1 em sua cavidade peritoneal). Além disso, a adição de células B-1 a culturas de células peritoneais provenientes de camundongos Xid aumentou a quantidade de IL10 secretada, sugerindo que a célula B-1 secreta essa citocina em níveis suficientes para induzir macrófagos a um estado menos pró-inflamatório e secretor de IL10. Outro achado que corrobora essa interpretação é que as células B-1 derivadas de camundongos IL10 KO (*knockout*) não foram capazes de suprimir funções de macrófagos.

Considerando que as células T regulatórias estão presentes de forma abundante no intestino e são secretoras de IL10 (Schiering *et al.*, 2014), não podemos descartar a possível contribuição que elas podem ter para os níveis circulantes de IL10 na fase aguda da inflamação. Entretanto, não foram encontrados estudos que investiguem essa participação em modelos de inflamação sistêmica.

1.4 Produção sistêmica de TNF e IL10: órgãos principais

Anteriormente, estudos com esplenectomia em ratos sugeriam que a principal fonte de TNF na inflamação sistêmica era macrófagos do baço, uma vez que a remoção desse órgão fazia os níveis de TNF circulante caírem drasticamente (Huston et al., 2006; Mizukami et al., 1999). Entretanto, esse argumento foi contestado por modelos com hepatectomia parcial ou total, nos quais os níveis de TNF plasmático também apresentavam uma queda significativa com a retirada do fígado (Fang, Jin, et al., 2018; Fang, Liu, et al., 2018; Kumins et al., 1996).

Para solucionar esse impasse, um recente estudo do nosso laboratório (Fonseca et al., 2021) avaliou como a remoção do baço ou fígado em ratos impacta a expressão de *Tnf* nos outros órgãos, além dos níveis plasmáticos de TNF durante a inflamação sistêmica. Nesse modelo, a remoção do fígado reduziu o nível circulante da citocina, mas não alterou a expressão de *Tnf* no baço e nem no pulmão. Já a remoção do baço, além de reduzir os níveis plasmáticos da citocina, também diminuiu a expressão gênica no fígado. Esses resultados levaram à dedução de que o baço seria responsável por modular a secreção de TNF pelo fígado, que por sua vez seria a principal fonte da citocina circulante. Após outros experimentos no estudo, foi revelado que essa comunicação acontece através do mediador lipídico leucotrieno B₄ (LTB₄), que é secretado por macrófagos do baço e induz a expressão de *Tnf* por macrófagos do fígado, as células de Kupffer (KC) (**Figura 10**). Para mensurar a participação total do fígado para os níveis plasmáticos de TNF, foi feita uma correção por massa, levando em consideração que a hepatectomia parcial reduziu em 1/3 os níveis de TNF circulante, e chegou-se à conclusão de que o fígado total seja responsável pela produção de, aproximadamente, 50% do TNF circulante. Convém ressaltar que a veia porta hepática drena o sangue diretamente do baço, estômago, pâncreas, intestino delgado e grosso para o fígado, e que as KC possuem uma localização distinta intraluminal que favorece o contato dessas células com as substâncias provenientes da circulação portal (Krenkel & Tacke, 2017).

Esse novo mecanismo encontrado evidencia uma nova perspectiva acerca da inflamação sistêmica: a interação entre os órgãos é crucial para a regulação das citocinas.

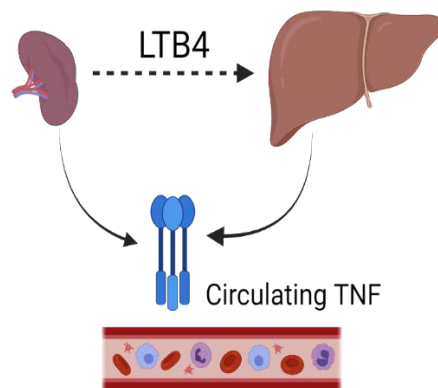


Figura 10. Mecanismo de comunicação espleno-hepática envolvido na produção de TNF circulante. Macrófagos esplênicos secretam LTB_4 , que chega no fígado através da veia porta hepática e estimula as células de Kupffer a secretarem TNF. Assim, o fígado se torna responsável por cerca de 50% do TNF circulante na inflamação sistêmica. Mecanismo revelado por *Fonseca et al., 2021*. Figura produzida pela autora com *BioRender*.

Apesar do fígado ter sido apontado como a fonte principal de TNF circulante na fase inicial da inflamação sistêmica, **a contribuição relativa de diferentes órgãos para a outra metade dos níveis circulantes ainda não é esclarecida**. O método de remoção de órgãos não parece evidenciar uma participação direta, uma vez que pode ocorrer alterações em eixos de regulação entre diferentes órgãos. **Visto isso, outras abordagens se fazem necessárias, e aqui propomos avaliar a expressão de *Tnf* em diferentes órgãos e associá-la aos níveis plasmáticos da citocina.**

Além dos macrófagos do eixo baço-fígado, sabe-se que os macrófagos alveolares do pulmão são produtores de TNF tanto em situações fisiológicas quanto patológicas, contudo não se sabe a participação relativa desse órgão para os níveis plasmáticos da citocina. Em modelos de inflamação sistêmica em ratos, a expressão de *Tnf* em pulmões de animais controle (injeção de salina) foi maior que no fígado e no baço, contudo, a administração de LPS i.v. aumentou menos a expressão de *Tnf* no pulmão do que em outros órgãos (Fonseca et al., 2021). Assim, apesar da produção constitutiva de TNF pulmonar, não existem evidências de uma contribuição desse órgão para os níveis circulantes da citocina sob estímulos inflamatórios.

Os dados sobre a contribuição do rim em um contexto sistêmico de produção de TNF durante a inflamação também são escassos. Se sabe, contudo, que o TNF é produzido pelo rim em situações não inflamatórias e sua ação local faz parte do mecanismo de regulação da pressão arterial, através do transporte de Na^+ e K^+ que ocorrem nos túbulos distais dos néfrons (Hao et al., 2018). Além disso, em estudo com choque hemorrágico (Guedes Jr et al., 2012), no qual há um aumento de TNF

circulante no início da resposta, foi visto que a expressão de *Tnf* estava aumentada, sugerindo que esse órgão consegue regular a produção dessa citocina de forma rápida em situações de choque hipovolêmico.

No que tange ao equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória, o intestino trabalha com esse aspecto do sistema imune de forma muito característica, já que possui uma alta capacidade de tolerância, mas também um limiar para o qual a resposta pró-inflamatória é ativada em caso de quebra da barreira e entrada de patógenos. Muitos trabalhos vêm se dedicando a estudar a interação imune local nas doenças intestinais, bem como a relação da microbiota com outros sistemas do organismo (Di Lorenzo et al., 2019; Mao et al., 2020; Z. Zhang et al., 2019), mas os modelos de colite e outras patologias induzidas estão mais associadas com a resposta imune adquirida, que não é o foco deste trabalho. Sabe-se que os macrófagos residentes do intestino produzem uma grande quantidade de IL10, que age de forma local (Morhardt et al., 2019) e que a expressão de *Tnf* no intestino, durante a fase aguda da inflamação sistêmica, aumenta (Barbeiro, 2009). Entretanto, a participação relativa desse órgão para os níveis circulantes dessas citocinas ainda não é compreendida.

Com relação à IL10, sua principal (ou principais) origem em nível sistêmico ainda é pouco compreendida. No trabalho de *Fonseca et al.* (Fonseca et al., 2021), a hepatectomia não alterou os níveis plasmáticos de IL10 e nem a expressão no baço e pulmão, o que sugere uma participação não tão significativa do fígado para os níveis sistêmicos dessa citocina no modelo estudado. Em outro trabalho citado anteriormente (Barbeiro, 2009), o intestino e pulmão foram avaliados na produção de IL10 durante inflamação sistêmica induzida por LPS em camundongos, e foi encontrado que, 90 min após o estímulo, os níveis de IL10 nesses órgãos caíram significativamente em camundongos sem células B-1, sugerindo a importância tanto desse subtipo celular quanto desses órgãos para a produção de IL10. Ainda são necessários mais estudos para um melhor entendimento da origem dessa citocina na inflamação sistêmica.

Em suma, apesar de sabermos que macrófagos são as principais células produtoras de TNF, ainda é pouco estudada a contribuição relativa dos diferentes órgãos para os níveis circulantes dessa citocina. Já para IL10, ainda não sabemos quais os órgãos e células são mais relevantes para seu nível

circulante. Buscando preencher essas lacunas, a proposta deste estudo é investigar quais os principais órgãos que se correlacionam com os níveis circulantes dessas citocinas no primeiro momento da inflamação sistêmica, mediante diferentes intensidades de insulto inflamatório induzido por lipopolissacarídeo bacteriano.

1.5 Modelo de inflamação sistêmica

A administração de LPS em animais é amplamente utilizada para a indução da inflamação sistêmica, que, na sua fase inicial, possui diversas semelhanças com a manifestação sistêmica de infecções em pacientes e em modelos animais de infecção. Uma das principais semelhanças é o aparecimento precoce de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1 β , e de citocinas anti-inflamatórias, principalmente a IL10.

Em modelos de inflamação com LPS, a cinética de circulação do TNF envolve um aumento logo nos primeiros minutos após a administração do estímulo, atingindo um pico entre 1 e 2 horas, e, após esse período, há uma queda com rápido *clearance* da citocina circulante (Colson et al., 2003; Held et al., 2019). Essa cinética é semelhante à vista em pacientes sépticos. Em estudo de monitoramento com pacientes que passaram por nefrolitotomia percutânea, um procedimento que tem alta incidência de sepse nas primeiras horas após cirurgia (Neilson et al., 1996), foi visto que pacientes que desenvolveram sepse apresentaram níveis de TNF aumentados, que atingiram um pico entre 2 e 4 horas após a cirurgia, e depois diminuíram, em uma cinética similar aos estudos citados com modelos de LPS.

Com relação à IL10, a cinética de aparecimento após o LPS é bifásica, sendo que o primeiro pico aparece junto com TNF, entre 1 e 2 horas após o estímulo, e, após o decaimento da citocina circulante, ela volta a aparecer com uma magnitude maior na circulação após cerca de 30 horas (Erickson & Banks, 2011). Entretanto, ainda são escassos na literatura os estudos de cinética da IL10 logo após o estímulo inflamatório, uma vez que o enfoque da maioria das pesquisas com essa citocina é na fase tardia da infecção/inflamação, quando ela já se encontra na segunda fase de circulação.

A inflamação sistêmica causada pelo LPS também possui semelhanças com a resposta sistêmica a infecções no que diz respeito às alterações termometabólicas

nos momentos iniciais. Em experimentos com modelos de inflamação sistêmica em ratos induzidos por LPS comparado com infecção por *Escherichia coli* (E. Liu et al., 2012), ambos os grupos desenvolvem febre logo após o estímulo inflamatório ser administrado. O primeiro episódio febril ocorre em 30 minutos e precede o pico de TNF, sendo provavelmente mediada por PGE₂, e o segundo episódio febril aparece junto com o aumento de TNF na circulação, uma citocina sabidamente pirógena (E. Liu et al., 2012; Steiner et al., 2006). Entretanto, em doses mais altas de LPS (acima de 500 µg/kg) há uma mudança de febre para hipotermia (Garami et al., 2018), e essa alteração parece ser regulada e possuir valor adaptativo (E. Liu et al., 2012). Nessa perspectiva, um estudo com coorte de pacientes sépticos (Fonseca et al., 2016), no qual a hipotermia foi permitida ocorrer sem intervenção, mostrou que, aproximadamente, 97% dos episódios de hipotermia foram autolimitados e transitórios, corroborando para a ideia de que a hipotermia é uma resposta térmica regulada mediante uma inflamação sistêmica grave.

Considerando as semelhanças entre o modelo de inflamação sistêmica com LPS e a resposta sistêmica a infecções, é interessante destacar os motivos pelos quais optamos pelo modelo com LPS em detrimento dos modelos de indução de sepse, como contaminação e infecção peritoneal (CPI) e ligação e perfuração cecal (CLP). Pelo fato de ser um potente ativador de TLR4, o LPS consegue induzir uma rápida produção de citocinas inflamatórias em concentrações mais elevadas e facilmente detectáveis quando comparado a modelos sépticos (Remick et al., 2000). Além disso, por ser um modelo de fácil administração e mais bem padronizado, possui uma alta reprodutibilidade e menor desvio padrão nas respostas inflamatórias entre animais (Seemann et al., 2017), o que é uma vantagem considerável no nosso estudo, uma vez que comparamos diferentes grupos com quantidades distintas de LPS. Além disso, utilizamos ratos pelo fato de ser um animal de maior porte que o camundongo, e, portanto, fornece uma maior quantidade de material para análise, principalmente se considerarmos a quantidade de plasma necessária para fazer as análises de citocinas circulantes.

Considerando todos os fatores citados, estabelecemos o LPS como o modelo mais adequado para o nosso estudo na fase inicial da inflamação sistêmica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do nosso trabalho indicam que, no modelo de inflamação sistêmica induzida por LPS em ratos, o fígado parece ser uma fonte importante de TNF circulante em diferentes intensidades de estímulo inflamatório, e que, além do fígado, o intestino também pode ter uma contribuição significativa para os níveis sistêmicos da citocina. Além disso, o fígado não parece ter uma contribuição relevante para os níveis plasmáticos de IL10, e, dos órgãos avaliados, o intestino parece ser a única fonte considerável de IL10 circulante.

7 REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Imunologia Celular e Molecular*. [Tradução Anderson de Sá Nunes; Soraya Imon de Oliveira] -9. ed.- Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.
- Abraham, E., Wunderink, R., Silverman, H., Perl, T. M., Nasraway, S., Levy, H., Bone, R., Wenzel, R. P., Balk, R., & Allred, R. (1995). Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA*, 273(12), 934–941.
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3), 651–665. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>
- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 361–371. <https://doi.org/10.1038/nrc2628>
- Barbeiro, D. F. (2009). *Participação da Célula B-1 na resposta inflamatória ao Lipopolissacáride*.
- Barsig, J., Küsters, S., Vogt, K., Volk, H.-D., Tiegs, G., & Wendel, A. (1995). Lipopolysaccharide-induced interleukin-10 in mice: role of endogenous tumor necrosis factor- α . *European Journal of Immunology*, 25(10), 2888–2893. <https://doi.org/10.1002/eji.1830251027>
- Bathon, J. M., Martin, R. W., Fleischmann, R. M., Tesser, J. R., Schiff, M. H., Keystone, E. C., Genovese, M. C., Wasko, M. C., Moreland, L. W., Weaver, A. L., Markenson, J., & Finck, B. K. (2000). A Comparison of Etanercept and Methotrexate in Patients with Early Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 343(22), 1586–1593. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011303432201>
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y.-C. E., Mathison, J., Ulevitch, R., & Cerami, A. (1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, 316(6028), 552–554. <https://doi.org/10.1038/316552a0>
- Boeuf, P. S., Loizon, S., Awandare, G. A., Tetteh, J. K., Addae, M. M., Adjei, G. O., Goka, B., AL Kurtzhals, J., Puijalón, O., Hviid, L., Akanmori, B. D., & Behr, C. (2012). Insights into deregulated TNF and IL10 production in malaria: implications for understanding severe malarial anaemia. *Malaria Journal*, 11(1), 253. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-253>
- Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M. R., & Heesemann, J. (2011). Novel Highly Sensitive IL10- β -Lactamase Reporter Mouse Reveals Cells of the Innate Immune System as a Substantial Source of IL10 In Vivo. *The Journal of Immunology*, 187(6), 3165–3176. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101477>
- Bronte, V. (2009). Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: Uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *European Journal of Immunology*, 39(10), 2670–2672. <https://doi.org/10.1002/eji.200939892>
- Brudecki, L., Ferguson, D. A., McCall, C. E., & el Gazzar, M. (2012). Myeloid-Derived Suppressor Cells Evolve during Sepsis and Can Enhance or Attenuate the Systemic

- Inflammatory Response. *Infection and Immunity*, 80(6), 2026–2034. <https://doi.org/10.1128/IAI.00239-12>
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9), 3666–3670. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3666>
- Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, Y., Ali, M. M., McGuire, F., Nagarkatti, P. S., & Nagarkatti, M. (2013). Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In vivo (Athens, Greece)*, 27(6), 669–684. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292568>
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science*, 296(5573), 1634–1635. <https://doi.org/10.1126/science.1071924>
- Chousterman, B. G., Swirski, F. K., & Weber, G. F. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*, 39(5), 517–528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>
- Coley, W. B. (1891). CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF SARCOMA. *Annals of Surgery*, 14, 199–220. <https://doi.org/10.1097/00000658-189112000-00015>
- Coley, W. B. (1910). The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3(Surg Sect), 1–48.
- Colson, A., Willems, B., & Thissen, J. (2003). Inhibition of TNF-alpha production by pentoxifylline does not prevent endotoxin-induced decrease in serum IGF-I. *Journal of Endocrinology*, 178(1), 101–109. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1780101>
- Daley, J. M., Ivanenko-Johnston, T., Reichner, J. S., & Albina, J. E. (2005). Transcriptional regulation of TNF- α production in neutropenia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(2), R409–R412. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00322.2004>
- Darif, D., Hammi, I., Kihel, A., El Idrissi Saik, I., Guessous, F., & Akarid, K. (2021). The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microbial Pathogenesis*, 153, 104799. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104799>
- Di Lorenzo, F., De Castro, C., Silipo, A., & Molinaro, A. (2019). Lipopolysaccharide structures of Gram-negative populations in the gut microbiota and effects on host interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), 257–272. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz002>
- Donnelly, R. P., Sheikh, F., Kotenko, S. V., & Dickensheets, H. (2004). The expanded family of class II cytokines that share the IL10 receptor-2 (IL10R2) chain. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(2), 314–321. <https://doi.org/10.1189/jlb.0204117>
- Elabscience®. *ELISA kit*. Acesso em 7 de julho de 2022, disponível em: < https://www.elabscience.com/prat_tnf_alpha_tumor_necrosis_factor_alpha_elisa_kit-458490.html >.
- Erickson, M. A., & Banks, W. A. (2011). Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: Multiplex quantification

- with path analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(8), 1637–1648. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.006>
- Fang, H., Jin, H., Hua, C., Liu, A., Song, Z., Chen, X., Dirsch, O., & Dahmen, U. (2018). The LPS Responsiveness in BN and LEW Rats and Its Severity Are Modulated by the Liver. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/6328713>
- Fang, H., Liu, A., Chen, X., Cheng, W., Dirsch, O., & Dahmen, U. (2018). The severity of LPS induced inflammatory injury is negatively associated with the functional liver mass after LPS injection in rat model. *Journal of Inflammation*, 15(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12950-018-0197-4>
- Filliol, A., Piquet-Pellorce, C., Raguénès-Nicol, C., Dion, S., Farooq, M., Lucas-Clerc, C., Vandenaabeele, P., Bertrand, M. J. M., Le Seyec, J., & Samson, M. (2017). RIPK1 protects hepatocytes from Kupffer cells-mediated TNF-induced apoptosis in mouse models of PAMP-induced hepatitis. *Journal of Hepatology*, 66(6), 1205–1213. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.005>
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, 170(6), 2081–2095. <https://doi.org/10.1084/jem.170.6.2081>
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., & O'Garra, A. (1991). IL10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 146(10), 3444–3451.
- Fonseca, M. T., Moretti, E. H., Marques, L. M. M., Machado, B. F., Brito, C. F., Guedes, J. T., Komegae, E. N., Vieira, T. S., Festuccia, W. T., Lopes, N. P., & Steiner, A. A. (2021). A leukotriene-dependent spleen-liver axis drives TNF production in systemic inflammation. *Science Signaling*, 14(679). <https://doi.org/10.1126/scisignal.abb0969>
- Fonseca, M. T., Rodrigues, A. C., Cezar, L. C., Fujita, A., Soriano, F. G., & Steiner, A. A. (2016). Spontaneous hypothermia in human sepsis is a transient, self-limiting, and nonterminal response. *Journal of Applied Physiology*, 120(12), 1394–1401. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00004.2016>
- Fringuello, A., Tatman, P. D., Wroblewski, T., Thompson, J. A., Yu, X., Lillehei, K. O., Kowalski, R. G., & Graner, M. W. (2021). Cytokine-laden extracellular vesicles predict patient prognosis after cerebrovascular accident. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22157847>
- Gabanyi, I., Muller, P. A., Feighery, L., Oliveira, T. Y., Costa-Pinto, F. A., & Mucida, D. (2016). Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell*, 164(3), 378–391. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.023>
- Ganeshan, K., Nikkanen, J., Man, K., Leong, Y. A., Sogawa, Y., Maschek, J. A., Van Ry, T., Chagwedera, D. N., Cox, J. E., & Chawla, A. (2019). Energetic Trade-Offs and Hypometabolic States Promote Disease Tolerance. *Cell*, 177(2), 399–413.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.050>
- Garami, A., Steiner, A. A., & Romanovsky, A. A. (2018). *Fever and hypothermia in systemic inflammation* (p. 565–597). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00034-3>

- Giri, J., Das, R., Nylen, E., Chinnadurai, R., & Galipeau, J. (2020). CCL2 and CXCL12 Derived from Mesenchymal Stromal Cells Cooperatively Polarize IL10+ Tissue Macrophages to Mitigate Gut Injury. *Cell Reports*, 30(6), 1923-1934.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.047>
- Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E. M., Schäffer, A. A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., Hätscher, N., Pfeifer, D., Sykora, K.-W., Sauer, M., Kreipe, H., Lacher, M., Nustede, R., Woellner, C., Baumann, U., ... Klein, C. (2009). Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor. *New England Journal of Medicine*, 361(21), 2033–2045. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907206>
- Greenberger, M. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Danforth, J. M., Goodman, R. E., & Standiford, T. J. (1995). Neutralization of IL10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(2), 722–729.
- Guedes Jr, F. S., Cruz, D. S. da, Rodrigues, M. M. P., Silva, L. M. da, Amorim, R. L., Vianna, P. T. G., & Castiglia, Y. M. M. (2012). Renal histology and immunohistochemistry after acute hemorrhage in rats under sevoflurane and ketoprofen effect. *Acta Cirurgica Brasileira*, 27(1), 37–42. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502012000100007>
- Han, H., Ma, Q., Li, C., Liu, R., Zhao, L., Wang, W., Zhang, P., Liu, X., Gao, G., Liu, F., Jiang, Y., Cheng, X., Zhu, C., & Xia, Y. (2020). Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL10 are disease severity predictors. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1123–1130. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1770129>
- Han, Y.-H., Onufer, E. J., Huang, L.-H., Sprung, R. W., Davidson, W. S., Czepielewski, R. S., Wohltmann, M., Sorci-Thomas, M. G., Warner, B. W., & Randolph, G. J. (2021). Enterically derived high-density lipoprotein restrains liver injury through the portal vein. *Science*, 373(6553). <https://doi.org/10.1126/science.abe6729>
- Hao, S., Hao, M., & Ferreri, N. R. (2018). Renal-Specific Silencing of TNF (Tumor Necrosis Factor) Unmasks Salt-Dependent Increases in Blood Pressure via an NKCC2A (Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter Isoform A)-Dependent Mechanism. *Hypertension*, 71(6), 1117–1125. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10764>
- Held, F., Hoppe, E., Cvijovic, M., Jirstrand, M., & Gabrielsson, J. (2019). Challenge model of TNF α turnover at varying LPS and drug provocations. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 46(3), 223–240. <https://doi.org/10.1007/s10928-019-09622-x>
- Henry, B. M., Benoit, S. W., Vikse, J., Berger, B. A., Pulvino, C., Hoehn, J., Rose, J., Santos de Oliveira, M. H., Lippi, G., & Benoit, J. L. (2021). The anti-inflammatory cytokine response characterized by elevated interleukin-10 is a stronger predictor of severe disease and poor outcomes than the pro-inflammatory cytokine response in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 59(3), 599–607. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1284>
- Hewett, J. A., Jean, P. A., Kunkel, S. L., & Roth, R. A. (1993). Relationship between tumor necrosis factor-alpha and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 265(6), G1011–G1015. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1993.265.6.G1011>

- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*, *11*(9), 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Hocke, A., Ermet, M., Althoff, A., Brell, B., Nguessan, P., Suttorp, N., & Ermert, L. (2006). Regulation of interleukin IL-4, IL-13, IL10, and their downstream components in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. Comparison of the constitutive expression between rats and humans. *Cytokine*, *33*(4), 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.01.007>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford, England)*, *49*(7), 1215–1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(3), 260–268. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70001-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70001-X)
- Huston, J. M., Ochani, M., Rosas-Ballina, M., Liao, H., Ochani, K., Pavlov, V. A., Gallowitsch-Puerta, M., Ashok, M., Czura, C. J., Foxwell, B., Tracey, K. J., & Ulloa, L. (2006). Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(7), 1623–1628. <https://doi.org/10.1084/jem.20052362>
- Islam, H., Chamberlain, T. C., Mui, A. L., & Little, J. P. (2021). Elevated Interleukin-10 Levels in COVID-19: Potentiation of Pro-Inflammatory Responses or Impaired Anti-Inflammatory Action? *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.677008>
- Jacobse, J., Li, J., Rings, E. H. H. M., Samsom, J. N., & Goettel, J. A. (2021). Intestinal Regulatory T Cells as Specialized Tissue-Restricted Immune Cells in Intestinal Immune Homeostasis and Disease. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.716499>
- Jose, P., Avdiushko, M. G., Akira, S., Kaplan, A. M., & Cohen, D. A. (2009). INHIBITION OF INTERLEUKIN-10 SIGNALING IN LUNG DENDRITIC CELLS BY TOLL-LIKE RECEPTOR 4 LIGANDS. *Experimental Lung Research*, *35*(1), 1–28. <https://doi.org/10.1080/01902140802389727>
- Kawakami, M., Pekala, P. H., Lane, M. D., & Cerami, A. (1982). Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(3), 912–916. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.3.912>
- Kedmi, R., Najar, T. A., Mesa, K. R., Grayson, A., Kroehling, L., Hao, Y., Hao, S., Pokrovskii, M., Xu, M., Talbot, J., Wang, J., Germino, J., Lareau, C. A., Satpathy, A. T., Anderson, M. S., Laufer, T. M., Aifantis, I., Bartleson, J. M., Allen, P. M., ... Littman, D. R. (2022). A RORγt+ cell instructs gut microbiota-specific Treg cell differentiation. *Nature*, *610*(7933), 737–743. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05089-y>
- Kim, H. J., Na, J. I., Min, B. W., Na, J. Y., Lee, K. H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Kim, H. S., & Park, J. T. (2014). Evaluation of Protein Expression in Housekeeping Genes across Multiple

- Tissues in Rats. *Korean Journal of Pathology*, 48(3), 193. <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2014.48.3.193>
- Kim, K. Y., Kim, M. Y., Choi, H. S., Jin, B. K., Kim, S. U., & Lee, Y. B. (2002). Thrombin induces IL10 production in microglia as a negative feedback regulator of TNF- α release. *Neuroreport*, 13(6), 849–852. <https://doi.org/10.1097/00001756-200205070-00022>
- Koay, M. A., Gao, X., Washington, M. K., Parman, K. S., Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., & Christman, J. W. (2002). Macrophages Are Necessary for Maximal Nuclear Factor- κ B Activation in Response to Endotoxin. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(5), 572–578. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.5.4748>
- Komegae, E. N., Fonseca, M. T., da Silveira Cruz-Machado, S., Turato, W. M., Figueiras, L. R., Markus, R. P., & Steiner, A. A. (2019). Site-Specific Reprogramming of Macrophage Responsiveness to Bacterial Lipopolysaccharide in Obesity. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01496>
- König, R., Kolte, A., Ahlers, O., Oswald, M., Krauss, V., Roell, D., Sommerfeld, O., Dimopoulos, G., Tsangaris, I., Antoniadou, E., Jaishankar, N., Bogatsch, H., Löffler, M., Rödel, M., Garcia-Moreno, M., Tuchscher, L., Sprung, C. L., Singer, M., Brunkhorst, F., ... Bauer, M. (2021). Use of IFN γ /IL10 Ratio for Stratification of Hydrocortisone Therapy in Patients With Septic Shock. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607217>
- Koo, D. J., Zhou, M., Jackman, D., Cioffi, W. G., Bland, K. I., Chaudry, I. H., & Wang, P. (1999). Is gut the major source of proinflammatory cytokine release during polymicrobial sepsis? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1454(3), 289–295. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(99\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(99)00045-9)
- Krenkel, O., & Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 306–321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., & Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263–274. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80068-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80068-P)
- Kumins, N. H., Hunt, J., Gamelli, R. L., & Filkins, J. P. (1996). PARTIAL HEPATECTOMY REDUCES THE ENDOTOXIN-INDUCED PEAK CIRCULATING LEVEL OF TUMOR NECROSIS FACTOR IN RATS. *Shock*, 5(5), 385–388. <https://doi.org/10.1097/00024382-199605000-00012>
- Lewkowicz, N., Mycko, M. P., Przygodzka, P., Ćwiklińska, H., Cichalewska, M., Matysiak, M., Selmaj, K., & Lewkowicz, P. (2016). Induction of human IL10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL10. *Mucosal Immunology*, 9(2), 364–378. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.66>
- Lippitz, B. E. (2013). Review Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. Em www.thelancet.com/oncology (Vol. 14). www.thelancet.com/oncology
- Lipsky, P. E., van der Heijde, D. M., St Clair, E. W., Furst, D. E., Breedveld, F. C., Kalden, J. R., Smolen, J. S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G. R., Maini, R. N., & Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy

- Study Group. (2000). Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *The New England journal of medicine*, 343(22), 1594–1602. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011303432202>
- Liu, B., Li, M., Zhou, Z., Guan, X., & Xiang, Y. (2020). Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)? *Journal of Autoimmunity*, 111, 102452. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102452>
- Liu, E., Lewis, K., Al-Saffar, H., Krall, C. M., Singh, A., Kulchitsky, V. A., Corrigan, J. J., Simons, C. T., Petersen, S. R., Musteata, F. M., Bakshi, C. S., Romanovsky, A. A., Sellati, T. J., & Steiner, A. A. (2012). Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(12), R1372–R1383. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00023.2012>
- Louis, E., Vermeire, S., Rutgeerts, P., De Vos, M., Van Gossum, A., Pescatore, P., Fiasse, R., Pelckmans, P., Reynaert, H., D'Haens, G., Malaise, M., & Belaiche, J. (2002). A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 37(7), 818–824.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Mao, J., Qi, S., Cui, Y., Dou, X., Luo, X. M., Liu, J., Zhu, T., Ma, Y., & Wang, H. (2020). Lactobacillus rhamnosus GG Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Barrier Dysfunction by Regulating MAPK/NF- κ B Signaling and Modulating Metabolome in the Piglet Intestine. *The Journal of Nutrition*, 150(5), 1313–1323. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa009>
- McKinley, M. J., Martelli, D., Trevizan-Baú, P., & McAllen, R. M. (2022). Divergent splanchnic sympathetic efferent nerve pathways regulate interleukin-10 and tumour necrosis factor- α responses to endotoxaemia. *The Journal of Physiology*, 600(20), 4521–4536. <https://doi.org/10.1113/JP283217>
- Mease, P. J., Goffe, B. S., Metz, J., VanderStoep, A., Finck, B., & Burge, D. J. (2000). Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *The Lancet*, 356(9227), 385–390. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02530-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02530-7)
- Medzhitov, R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science*, 335(6071), 936–941. <https://doi.org/10.1126/science.1214935>
- Mege, J.-L., Meghari, S., Honstettre, A., Capo, C., & Raoult, D. (2006). The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(9), 557–569. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70577-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70577-1)
- Mizukami, T., Yokoyama, H., Okamura, Y., Ohgo, H., Fukuda, M., Kamegaya, Y., Kato, S., & Ishii, H. (1999). Splenectomy attenuates superoxide anion release into the hepatic sinusoids after lipopolysaccharide challenge. *Journal of Hepatology*, 31(2), 235–241. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(99\)80219-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(99)80219-0)

- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Morhardt, T. L., Hayashi, A., Ochi, T., Quirós, M., Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Kuffa, P., Atarashi, K., Honda, K., Kao, J. Y., Nusrat, A., & Kamada, N. (2019). IL10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Scientific Reports*, 9(1), 1223. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38125-x>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Murray, K. M., & Dahl, S. L. (1997). Recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) Fc fusion protein (TNFR:Fc) in rheumatoid arthritis. *The Annals of pharmacotherapy*, 31(11), 1335–1338. <https://doi.org/10.1177/106002809703101111>
- NCBI. National Library of Medicine. *Tnf, Homo sapiens*. Acesso em 9 de maio de 2022, disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124> >.
- NCBI. National Library of Medicine. *Tnf, Rattus norvegicus*. Acesso em 7 de agosto de 2022, disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24835> >.
- NCBI. National Library of Medicine. *Tnf, Mus musculus*. Acesso em 7 de agosto de 2022, disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21926> >.
- NCBI. National Library of Medicine. *Il10, Homo sapiens*. Acesso em 10 de maio de 2022, disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586> >.
- NCBI. National Library of Medicine. *Il10, Mus musculus*. Acesso em 14 de maio de 2022, disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16153> >.
- NCBI. National Library of Medicine. *Il10, Rattus norvegicus*. Acesso em 14 de junho de 2022, disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25325> >.
- Neilson, D., Kavanagh, J. P., & Rao, P. N. (1996). Kinetics of circulating TNF-alpha and TNF soluble receptors following surgery in a clinical model of sepsis. *Cytokine*, 8(12), 938–943. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0126>
- Ocuin, L. M., Bamboat, Z. M., Balachandran, V. P., Cavnar, M. J., Obaid, H., Plitas, G., & DeMatteo, R. P. (2010). Neutrophil IL10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(3), 423–432. <https://doi.org/10.1189/jlb.0810479>
- Okeke, E. B., & Uzonna, J. E. (2019). The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00680>
- O'Malley, W. E., Achinstein, B., & Shear, M. J. (1988). Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by Serum of Mice Treated with *Serratia Marcescens* Polysaccharide, and Induced Tolerance. *Nutrition Reviews*, 46(11), 389–391. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1988.tb05376.x>
- Opal, S. M., Dellinger, R. P., Vincent, J. L., Masur, H., & Angus, D. C. (2014). The next generation of sepsis clinical trial designs: What is next after the demise of recombinant

- human activated protein C? *Critical Care Medicine*, 42(7), 1714–1721. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000325>
- Opal, S. M., Fisher, C. J., Dhainaut, J.-F. A., Vincent, J.-L., Brase, R., Lowry, S. F., Sadoff, J. C., Slotman, G. J., Levy, H., Balk, R. A., Shelly, M. P., Pribble, J. P., LaBrecque, J. F., Lookabaugh, J., Donovan, H., Dubin, H., Baughman, R., Norman, J., DeMaria, E., ... Seneff, M. (1997). Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 25(7), 1115–1124. <https://doi.org/10.1097/00003246-199707000-00010>
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and Functions of the IL10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- Park, B. S., & Lee, J.-O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(12), e66–e66. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- Petitjean, S. J. L., Lecocq, M., Lelong, C., Denis, R., Defrère, S., Mariage, P.-A., Alsteens, D., & Pilette, C. (2022). Salvia miltiorrhiza Bunge as a Potential Natural Compound against COVID-19. *Cells*, 11(8), 1311. <https://doi.org/10.3390/cells11081311>
- Phillipson, M., & Kubes, P. (2011). The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, 17(11), 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/nm.2514>
- Pillay, J., Kamp, V. M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.-W., Ulfman, L. H., Leenen, L. P., Pickkers, P., & Koenderman, L. (2012). A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *Journal of Clinical Investigation*, 122(1), 327–336. <https://doi.org/10.1172/JCI57990>
- Popi, A. F., Lopes, J. D., & Mariano, M. (2004). Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology*, 113(3), 348–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01969.x>
- Remick, D. G., Newcomb, D. E., Bolgos, G. L., & Call, D. R. (2000). COMPARISON OF THE MORTALITY AND INFLAMMATORY RESPONSE OF TWO MODELS OF SEPSIS: LIPOPOLYSACCHARIDE VS. CECAL LIGATION AND PUNCTURE. *Shock*, 13(2), 110–116. <https://doi.org/10.1097/00024382-200013020-00004>
- Salkowski, C. A., Neta, R., Wynn, T. A., Strassmann, G., van Rooijen, N., & Vogel, S. N. (1995). Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS-induced cytokine gene expression and radioprotection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(6), 3168–3179.
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
- Saraiva, M., Vieira, P., & O'Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine*, 217(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
- Schiering, C., Krausgruber, T., Chomka, A., Fröhlich, A., Adelmann, K., Wohlfert, E. A., Pott, J., Griseri, T., Bollrath, J., Hegazy, A. N., Harrison, O. J., Owens, B. M. J., Löhning, M., Belkaid, Y., Fallon, P. G., & Powrie, F. (2014). The alarmin IL-33 promotes regulatory T-

- cell function in the intestine. *Nature*, 513(7519), 564–568. <https://doi.org/10.1038/nature13577>
- Seemann, S., Zohles, F., & Lupp, A. (2017). Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0370-8>
- Sens, J., Hoffmann, D., Lange, L., Vollmer Barbosa, P., Morgan, M., Falk, C. S., & Schambach, A. (2021). Knockout-Induced Pluripotent Stem Cells for Disease and Therapy Modeling of IL10-Associated Primary Immunodeficiencies. *Human Gene Therapy*, 32(1–2), 77–95. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.235>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., Poll, T. Der, Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Em JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 315, Número 8, p. 801–810). American Medical Association. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Steiner, A. A., Ivanov, A. I., Serrats, J., Hosokawa, H., Phayre, A. N., Robbins, J. R., Roberts, J. L., Kobayashi, S., Matsumura, K., Sawchenko, P. E., & Romanovsky, A. A. (2006). Cellular and Molecular Bases of the Initiation of Fever. *PLoS Biology*, 4(9), e284. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040284>
- Steiner, A. A., & Romanovsky, A. A. (2019). Energy Trade-offs in Host Defense: Immunology Meets Physiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(12), 875–878. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.08.012>
- Steinshamn, S., & Waage, A. (1992). Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice. *Infection and Immunity*, 60(10), 4003–4008. <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.4003-4008.1992>
- Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I., & Akira, S. (1999). Enhanced Th1 Activity and Development of Chronic Enterocolitis in Mice Devoid of Stat3 in Macrophages and Neutrophils. *Immunity*, 10(1), 39–49. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80005-9)
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, 249(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
- Tracey, M. D. K. J., & Cerami, Ph. D. A. (1994). TUMOR NECROSIS FACTOR: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. *Annual Review of Medicine*, 45(1), 491–503. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.491>
- Tsurumi, A., Que, Y.-A., Ryan, C. M., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G. (2016). TNF- α /IL10 Ratio Correlates with Burn Severity and May Serve as a Risk Predictor of Increased Susceptibility to Infections. *Frontiers in Public Health*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00216>

- van der Poll, T., Marchant, A., Keogh, C. V., Goldman, M., & Lowry, S. F. (1996). Interleukin-10 Impairs Host Defense in Murine Pneumococcal Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 174(5), 994–1000. <https://doi.org/10.1093/infdis/174.5.994>
- Varela, M. L., Mogildea, M., Moreno, I., & Lopes, A. (2018). Acute Inflammation and Metabolism. Em *Inflammation* (Vol. 41, Número 4, p. 1115–1127). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>
- Walter, M. R. (2014). *The Molecular Basis of IL10 Function: from Receptor Structure to the Onset of Signaling* (p. 191–212). https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_9
- Wang, J., Yang, X., Li, Y., Huang, J. an, Jiang, J., & Su, N. (2021). Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction. *Virology Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01588-y>
- Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Furst, D. E., Moreland, L. W., Weisman, M. H., Birbara, C. A., Teoh, L. A., Fischkoff, S. A., & Chartash, E. K. (2003). Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. *Arthritis & Rheumatism*, 48(1), 35–45. <https://doi.org/10.1002/art.10697>
- Zelová, H., & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
- Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., & Lo-Man, R. (2009). Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity*, 31(5), 761–771. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.016>
- Zhang, Z., Wang, Y., Chen, L., & Li, Z. (2019). Protective effects of the suppressed NF- κ B/TLR4 signaling pathway on oxidative stress of lung tissue in rat with acute lung injury. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 35(5), 265–276. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12065>
- Zhang, Z., Zhang, D., Xie, K., Wang, C., & Xu, F. (2021). Luteolin activates Tregs to promote IL10 expression and alleviating caspase-11-dependent pyroptosis in sepsis-induced lung injury. *International Immunopharmacology*, 99, 107914. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107914>