

CRYSTAL CIPRIANO

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA  
TEMPERATURA NA MODULAÇÃO FUNCIONAL  
DE MACRÓFAGOS



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE  
GÓES UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2023

**Trabalho realizado no Departamento de Imunologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor (a) Alessandra D Almeida Filardy e coorientação de Kamila Guimarães Pinto e Jesuíno Rafael Machado Ferreira.**

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

C577a      Cipriano, Crystal  
            Avaliação da influência da temperatura na  
modulação funcional de macrófagos / Crystal  
Cipriano. -- Rio de Janeiro, 2023.  
            55 f.

            Orientadora: Alessandra D Almeida Filardy.  
            Coorientadora: Kamila Guimarães Pinto.  
            Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2023.

            1. Sistema imunológico. 2. Febre. 3. Células  
Fagocíticas. 4. Lipopolissacarídeo. 5. Streptococcus  
pneumoniae . I. D Almeida Filardy, Alessandra ,  
orient. II. Guimarães Pinto, Kamila, coorient. III.  
Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): **Crystal Cipriano**

DRE: **120041205**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Elvira Saraiva (Presidente)  
 Prof. Flávia Lima Ribeiro Gomes  
 Prof. Alessandra Marcia da Fonseca Martins  
 Prof. Anderson Guimarães (Suplente)

Titulo da Monografia: **"Avaliação da influência da temperatura na modulação funcional de macrófagos"**

Local: **Sala Vermelha, IMPG / CCS / UFRJ**

Data e hora de início: **12 de dezembro de 2023 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de 12 de 2023.

NOTA:

9.0

Banca Examinadora:

*Elvira Saraiva*

Prof. Elvira Saraiva (Presidente)

9.0

*Flávia Lima Ribeiro Gomes*

Prof. Flávia Lima Ribeiro Gomes

9.0

*Alessandra Marcia da Fonseca Martins*

Prof. Alessandra Marcia da Fonseca Martins

Prof. Anderson Guimarães (Suplente)

*Crystal Cipriano*

Crystal Cipriano

Aluno(a):

Orientador(a)

(e coorientador):

*Alessandra D'Almeida F. Hardy*  
 Prof.ª. Alessandra D'Almeida F. Hardy, Kamila Guimarães Pinto e Jesuino Rafael Ferreira

Coordenadora de

TCC:

*Marinella Silva Laport*  
 Prof.ª. Marinella Silva Laport

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a Deus por sempre me iluminar e abençoar, principalmente durante esses anos de faculdade. Ele esteve ao meu lado em todos os momentos que precisei e me permitiu chegar até aqui.

Agradeço também imensamente aos meus pais, Alice e Ricardo, pelo suporte imensurável de sempre. Sabemos que chegar até aqui não foi fácil, e sem a força de vocês nada disso seria possível. Meu pai sempre tentando me ensinar a levar a vida de forma mais leve, e minha mãe sempre tendo os melhores conselhos, sabendo exatamente o que precisa ser dito em qualquer situação. Todas as vezes que tive que ir ao fundão aos finais de semana e feriados vocês nunca me deixaram sozinha e sempre estiveram lá comigo, fazendo diversas perguntas e querendo mexer em tudo do laboratório. Essa cumplicidade não tem preço. Isso aqui é por vocês e para vocês.

Vó Regina e tia Rachel também foram fundamentais nessa caminhada. Verdadeiros portos-seguros durante esse período. Jamais vou esquecer das velinhas acesas para a santinha que minha avó sempre colocava rezando por mim, e das conversas intermináveis que tinha com a minha tia, e a observava ouvindo minhas lamentações com a maior paciência e carinho do mundo. Nesse último ano de graduação, minha tia ainda me deu o presente mais lindo de todos, minha afilhada Valentina, que ilumina minha vida todos os dias.

A meus fiéis escudeiros, Luiz e Pedro, meus eternos agradecimentos por serem meus companheiros e confidentes. Vocês estiveram ao meu lado quando mais precisei, sempre oferecendo um ombro amigo e sendo os melhores ouvintes que eu poderia pedir. Dividimos todas as alegrias e tristezas, e vibramos juntos com cada conquista. Luiz, a pessoa com uns dos corações mais lindos que já conheci, e Pedro, meu gêmeo de alma. Somos família e somos para sempre. Cada um de vocês sempre terá um pedacinho reservado no meu coração.

Agradeço também a todos os amigos que fiz durante a graduação, que ajudaram nesse processo trazendo leveza para esses anos no fundão. Em especial, minhas meninas lindas Johari, Mariana, Lívia, Viviane e Carol, que vou levar para sempre na minha vida. Nossa cumplicidade foi além do que eu poderia esperar e hoje vejo quão fundamental foi para nós. Esse sexteto é para sempre! Sei que vocês ainda vão brilhar muito mais do que imaginam.

Falando nelas, minha primeiríssima amizade na faculdade foi a Carol, e nossa história é um tanto curiosa. Começou com uma mensagem pelo direct do Instagram em meio ao caos do recrutamento dos calouros; ela procurou o nome mais diferente possível na lista de chamada e decidiu mandar uma mensagem pedindo ajuda para entrar no grupo dos calouros. Coincidentemente, o nome mais esquisito era o meu, e nossa amizade começou logo de cara, quando falei para ela que São João de Meriti era muito longe da Ilha do Governador e que seria impossível para conseguirmos sair aos finais de semana e ela me respondeu que daríamos um jeito, e não é que deu certo?

Não posso deixar de agradecer ao laboratório que escolhi para desenvolver meu trabalho de conclusão de curso, Laboratório de Imunologia Celular. Minha orientadora Alessandra e minha coorientadora Kamila foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto e para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Também agradeço imensamente a minha companheira Ester, que em muitas etapas desse processo foi extremamente fundamental para mim. Nesses dois anos que fiquei no laboratório, conheci pessoas com realidades bastante diferentes da minha, mas com um objetivo maior em comum: fazer ciência. Nesse tempo, cresci, evolui, me frustrei, lidei com inúmeros experimentos mal-sucedidos, fiz amizades que vou levar para o resto da vida, como minhas meninas Juju, Letícia e Carol, mas principalmente, amadureci de formas que eu nem imaginava que precisava ainda. Muito obrigada por isso, LIC. Vou levar esses ensinamentos para a vida toda.

Falando nas amigadas que o laboratório me deu, Júlia foi minha maior e melhor surpresa desses dois anos. Chegou tímida, falando que não pretendia ficar muito tempo no laboratório e que queria apenas experimentar a rotina. Duas semanas depois, a cientista mirim já estava super envolvida com todos os projetos e mostrando para o que veio. Nossa amizade não aconteceu de primeira, longe disso, mas as diversas características em comum (ou não) e os perrengues do dia a dia foram nos aproximando cada vez mais, sem nem percebermos. Hoje, somos inseparáveis e não imagino mais a vida sem você, Ju. Seu apoio foi extremamente fundamental para estarmos aqui hoje, e acho que só nós duas sabemos o quanto. Olhar para você a qualquer hora do dia e começar a rir das nossas palhaçadas não tem preço. Saber que você sempre estará na plateia torcendo por mim não tem preço. Saber que posso contar com você para qualquer coisa não tem preço. Sua amizade não tem preço. Obrigada por ser meu pinguinho de serotonina nos dias mais difíceis, miguinha. Você é incrível! Somos para sempre!

Por fim, deixo claro que também sou extremamente grata pelo esclarecimento que esse tempo no laboratório me trouxe sobre a importância dos alunos de iniciação científica. Por muitas vezes, acabamos nos sentindo diminuídos e inferiores aos alunos de pós-graduação por sermos “meros alunos de IC”, e hoje, vejo que essa realidade é bastante deturpada. Não tenho conhecimento para falar sobre todos os laboratórios, mas no LIC, onde convivi por dois anos, eu e as meninas, Júlia, Letícia e Carol fomos uma verdadeira força tarefa e jamais podemos sentir-nos menosprezadas por conta disso! Muito pelo contrário, tenho muito orgulho de quem somos e o que representamos. Nossa união foi muito além do que eu poderia esperar e acho que foi exatamente como precisávamos, e por isso, muito obrigada, meninas. Torço demais por cada uma de vocês e desejo todo o sucesso e felicidade desse mundo. Ninguém solta a mão de ninguém!

Agradeço aos membros da banca por disponibilizarem seu tempo para avaliar e contribuir com meus resultados e o projeto do laboratório.

Agradeço também às agências de fomento, CNPq e FAPERJ.

**RESUMO**  
**CRYSTAL CIPRIANO**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA MODULAÇÃO  
FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

**ORIENTADOR: ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY**

A febre é uma resposta fisiológica caracterizada como um dos cinco sinais cardinais da inflamação (calor). A resposta febril é gerada a partir do reconhecimento de agentes pirogênicos, capazes de estimular células da imunidade inata e adaptativa a secretar citocinas pró-inflamatórias, que agem no centro de controle da temperatura no hipotálamo, aumentando a temperatura corporal, que por sua vez, auxilia no controle de replicação de patógenos. Os macrófagos, são células responsáveis pela eliminação de patógenos através do processo de fagocitose e acreditamos que seu funcionamento pode ser alterado por variações de temperatura durante infecções. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência da temperatura na modulação funcional de macrófagos. Para isso, foi realizado o plaqueamento de macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) juntamente com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* para análises funcionais. Nós verificamos que os macrófagos pré-estimulados com LPS foram capazes de fagocitar mais colônias *S.p* à 37°C do que à 39°C. Por outro lado, após 6 horas de infecção, os macrófagos pré-estimulados com LPS apresentaram um maior efeito microbicida à 39°C do que à 37°C. Foram capazes de fagocitar mais colônias *S.p* à 37°C do que à 39°C. Nós então, investigamos possíveis mecanismos que poderiam explicar essas diferenças no poder microbicida em distintas temperaturas, e verificamos que 6 e 24 horas após a infecção, a produção de nitritos, IL-6 e TNF foi prejudicada à 39°C se comparada à 37°C em macrófagos previamente estimulados com LPS. No entanto, a elevação da temperatura para 39°C não influenciou na liberação de IL-10 em macrófagos previamente estimulados com LPS e infectados com *S.p*. Dessa forma, até o momento, os resultados sugerem que a temperatura de 39°C prejudica algumas funções inflamatórias de macrófagos, mas não interfere no poder microbicida dessas células, apontando um possível comprometimento de sua atuação em temperaturas mais elevadas, como ocorre em cenários de febre.

**Palavras-chaves:** Sistema imunológico, febre, células fagocíticas, lipopolissacarídeo, *Streptococcus pneumoniae*

**ABSTRACT**  
**CRYSTAL CIPRIANO**

**EVALUATION OF THE INFLUENCY OF TEMPERATURE IN MACROPHAGE'S  
FUNCTIONAL MODULATION**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

**ADVISOR: ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY**

Fever is a physiological response characterized as one of the five cardinal signs of inflammation (heat). The febrile response is generated from the recognition of pyrogenic agents, capable of stimulating innate and adaptive immunity cells to secrete pro-inflammatory cytokines, which act on the temperature control center in the hypothalamus, increasing body temperature, which in turn, assists in controlling pathogen replication. Macrophages are cells responsible for eliminating pathogens through the process of phagocytosis and we believe that their functioning can be altered by temperature variations during infections. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of temperature on the functional modulation of macrophages. To this end, RAW 264.7 lineage macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS) were plated together with the bacterium *Streptococcus pneumoniae* for functional analysis. We found that macrophages pre-stimulated with LPS were able to phagocytose more *S.p.* colonies at 37°C than at 39°C. On the other hand, after 6 hours of infection, macrophages pre-stimulated with LPS showed a greater microbicidal effect at 39°C than at 37°C. We then investigated possible mechanisms that could explain these differences in microbicidal power at different temperatures, and found that 6 and 24 hours after infection, the production of nitrites, IL-6 and TNF was impaired at 39°C compared to 37°C in macrophages previously stimulated with LPS. However, raising the temperature to 39°C did not influence the release of IL-10 in macrophages previously stimulated with LPS and infected with *S.p.* Thus, so far, the results suggest that a temperature of 39°C impairs some inflammatory functions of macrophages but does not interfere with the microbicidal power of these cells, pointing to a possible impairment of their performance at higher temperatures, as occurs in fever scenarios.

**Key words:** Immune system, fever, phagocytic cells, lipopolysaccharide, *Streptococcus pneumoniae*

**RESUMO PARA LEIGOS  
CRYSTAL CIPRIANO**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA MODULAÇÃO  
FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS**

**ORIENTADOR: ALESSANDRA D'ALMEIDA FILARDY**

**Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A febre é um sintoma bastante comum, presente em grande parte das inflamações e infecções, sejam elas causadas por microrganismos, ou por reações que acontecem no próprio corpo. Ela está intimamente relacionada ao nosso sistema imunológico, aquele responsável pela vigilância e defesa do corpo, atuando como um membro adicional nesse processo de defesa, juntamente das citocinas produzidas nesse microambiente, moléculas secretadas por células imunológicas com funções pró ou anti-inflamatórias. Nesse contexto de sistema imunológico, encontram-se os macrófagos, células fagocíticas extremamente importantes da imunidade inata, que atuam englobando, “comendo” e matando microrganismos patogênicos e células defeituosas que causem algum desequilíbrio no organismo. Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo entender a relação da febre, e como esse estado afeta os macrófagos, o que pode implicar significativamente na compreensão de como nosso corpo responde a infecções, levando a novas abordagens para o tratamento de doenças. Nesse trabalho, utilizamos macrófagos de linhagem para a realização dos respectivos testes *in vitro* nas temperaturas de 37 e 39°C durante 6 e 24 horas. Para a estimulação dessas células, foi utilizada uma endotoxina presente na parede celular de um grande grupo de bactérias (Gram negativas), o lipopolissacarídeo (LPS). Em nossas análises, observamos que em temperaturas elevadas (39°C), os macrófagos apresentaram uma resposta inflamatória menos exacerbada de quando comparados com os grupos a 37°C, com uma menor produção de nitritos, moléculas produzidas em abundância em respostas inflamatórias e de estresse celular. Além disso, observamos que esses macrófagos a 39°C, apresentaram menor capacidade fagocítica, ou seja, menor capacidade de “comer” outras células, como confirmamos ao adicionar a bactéria *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) no meio contendo esses macrófagos. Já com relação a capacidade microbicida, ou seja, a capacidade de matar outras células, observamos que na temperatura de 39°C, os macrófagos apresentaram maior capacidade microbicida, evidenciando que são características reguladas de formas diferentes na célula, uma vez que as capacidades de “comer e matar outras células não estão obrigatoriamente relacionadas. Ao também analisar as citocinas, observamos que a temperatura de 37°C é capaz de induzir um estado pró-inflamatório, com produção de IL-6 e TNF nos grupos estimulados com LPS + *S.p.* Dessa forma, até o momento, os resultados indicam que macrófagos apresentam funções inflamatórias mais exacerbadas na temperatura de 37°C *in vitro*, apontando um possível

comprometimento de sua atuação em temperaturas mais elevadas, como ocorre em cenários de febre.

**Palavras-chave:** Sistema imunológico, febre, células fagocíticas, lipopolissacarídeo, *Streptococcus pneumoniae*

## ÍNDICE

Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Resumo para leigos .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Inflamação .....	13
1.2. Febre – fisiologia	
pirógenos.....	15
1.3. Febre e o sistema imunológico	
.....	19
1.4. Macrófagos e o sistema imunológico	
.....	22
2. JUSTIFICATIVA .....	26
3. OBJETIVOS .....	27
3.1. Objetivo geral .....	27
3.2. Objetivos específicos .....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
4.1. Bactéria .....	28
4.2. Preparação e padronização do inóculo.....	28
4.3. Cultura de células RAW 264.7.....	28
4.4. Plaqueamento e pré estímulo com LPS das células RAW 264.7 .....	29
4.5. Infecção <i>in vitro</i> por <i>Streptococcus pneumoniae</i> ....	29
4.6. Ensaio de capacidade fagocítica .....	30
4.7. Ensaio de capacidade microbicida.....	30
4.8. Dosagem de óxido nítrico.....	30
4.10. Dosagem de citocinas.....	31
4.11. Análise estatística .....	31
5. RESULTADOS .....	32
5.1. Temperatura elevada diminui a fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> por macrófagos.....	32

5.2. Temperatura elevada aumenta o potencial microbicida de macrófagos.....	34
5.3. Elevação da temperatura regula negativamente a produção de nitritos em macrófagos estimulados com LPS e infectados com a bactéria <i>S. pneumoniae</i> .....	37
5.4. Elevação da temperatura regula a produção de citocinas em macrófagos estimulados com LPS e infectados com a bactéria <i>S. pneumoniae</i> .....	38
6. DISCUSSÃO .....	41
7. CONCLUSÃO .....	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico Livre
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
ATP	Adenosina Trifosfato
CCL17	Ligante C-C de Quimiocina 17
CD	<i>Cluster</i> de Diferenciação
COX-2	Ciclooxigenase 2
COX-3	Ciclooxigenase 3
CXCL1	Ligante C-X-C de Quimiocinas 1
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol Lipase
DAMPs	Padrões Moleculares associados ao Dano Tecidual
DCs	Células Dendríticas
G-CSF	Fator Estimulatório de Colonias de Granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulatório de Colonias de Granulócitos e Macrófagos
HEV	Vênulas Endoteliais Altas
HSP70	Proteína de Choque Térmico 70
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IFN tipo I	Interferon do tipo I
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IFNAR	Receptor das subunidades alfa e beta de interferon
Ig	Imunoglobulina
IKK	Inibidor do Fator Nuclear-Kb Quinase
IL-	Interleucina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IP3	Inusitol Trifosfato 3
LFA-1	Antígeno Associado a Função Linfocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
lysoPC	Lisofosfatidilcolina
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
Mac-1	Antígeno de Macrófagos 1 do Receptor de Integrina
MHC I	Complexo de Histocompatibilidade I

MHC II	Complexo de Histocompatibilidade II
mPGES-1	Prostaglandina Microsomal Sintase E2
NK	Natural Killer
NLRs	Receptores do tipo NOD
NO	Óxido Nítrico
OVLT	Órgão Vascular da Lâmina Terminal
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H2
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina 2
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
Pros1	Proteína S
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PtdSer	Fosfatidilserina
RLRs	Receptores do tipo RIG
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RTK	Tirosina Quinase
SFB	Soro Fetal Bovino
SHBG	Globulina de ligação de hormônio sexual
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
SOCS1	Supressor de Citocinas de Sinalização 1
SOCS3	Supressor de Citocinas de Sinalização 3
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
TAM	Tyro 3, Axl e MerTk
TGF- $\beta$	Fator de Transformação de Crescimento beta
Th	Linfócitos T auxiliares
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TLRs	Receptores de Tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF6	Receptor Associado ao Fator de Necrose Tumoral 6
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular 1
VLA-4	Antígeno tardio 4



## 1. Introdução

### 1.1. Inflamação

A inflamação é um processo presente desde os primeiros seres primitivos que habitavam o planeta, inclusive, processos inflamatórios podem ser observados em fósseis jurássicos. Os sinais cardinais da inflamação foram primeiramente postulados A.C. por Aulus Cornelius Celsus, enciclopedista romano que afirmou: “*Notae vero inflammationis sunt quatuor: rubor et tumor cum calore and dolore*”, postulando os primeiros quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, edema e dor (Rather, 1971; Evans, Repasky e Fisher, 2015; Cavaillon, 2021). Posteriormente, a “perda de função” foi considerada como o quinto sinal. Os primeiros mediadores inflamatórios, como as toxinas anafiláticas, foram descritos em 1886 por Joseph von Fodor, que reportou a capacidade dessas toxinas de causar lise bacteriana e hemólise em associação com os anticorpos (Cavaillon, 2021; Venom, 2021).

De maneira geral, a inflamação é descrita como uma resposta fisiológica a infecções ou danos teciduais, podendo ter diferentes resoluções de acordo com o estímulo recebido. A resposta contra “ameaças” internas ou externas é prioridade nesse processo, a fim de evitar danos para o hospedeiro e retornar a homeostase. Logo, a inflamação envolve uma resposta evolutivamente adaptada, frente a uma quebra da homeostase, e por isso deve ser minuciosamente controlada, uma vez que atividades inflamatórias exacerbadas podem ser prejudiciais para o hospedeiro (Nathan, 2002; Medzhitov, 2008; Nathan e Ding, 2010). Processos inflamatórios são classificados em agudos ou crônicos, e locais ou sistêmicos, mas independente da classificação, o início da inflamação acontecerá da mesma forma: encontro com agentes indutores (que podem ser exógenos – patógenos e toxinas - ou endógenos – substâncias produzidas pelo próprio organismo que reportam estresse tecidual, mau funcionamento ou dano), sensores, mediadores e tecidos-alvo (Wright, 1997). Células que atuam como sensores, como macrófagos residentes de tecidos ou mastócitos, fazem parte da imunidade inata e atuam através da ativação de receptores específicos [PRRs – Receptores de Reconhecimento de Padrões – que reconhecem PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) ou DAMPs (Padrões moleculares associados ao dano tecidual)], e respondem produzindo diferentes mediadores inflamatórios para estimular as células efetoras, dependendo da via de sinalização induzida e da natureza dos indutores (Bianchi, 2007). Esses mediadores agem nos tecidos-alvo, alterando seu estado funcional, promovendo a eliminação dos agentes indutores, adaptação ao estado nocivo, e restauração da homeostase tecidual (Okin e Medzhitov, 2012; Schenten e Medzhitov, 2011; Hirayama, Lida e Nakase, 2017).

O processo inflamatório pode ser causado por agentes infecciosos, como vírus, bactérias, protozoários e fungos, mas também pode ser provocado por agentes físicos, como a perda da integridade da barreira da pele através de um corte, por exemplo. Em ambos os cenários, a inflamação será iniciada a partir do recrutamento de leucócitos e migração até o tecido-alvo para o reconhecimento e consequente resposta imunológica, em um processo conhecido como diapedese (Muller, 2003; Petri, Bixel, 2006). Nesse processo, as células endoteliais nos locais de infecção e tecidos danificados são ativadas por citocinas secretadas por macrófagos e outras células teciduais presentes nestes locais (por exemplo: Fator de necrose tumoral (TNF) e Interleucina-1 (IL-1)), resultando em expressão aumentada das moléculas de adesão e quimiocinas, uma vez que o recrutamento e a adesão dos leucócitos necessitam do envolvimento dessas células com moléculas da cobertura endotelial dos vasos sanguíneos (Springer, 1994; Muller, 2003). Nesse processo, selectinas, integrinas e quimiocinas trabalham em conjunto para regular a migração dos leucócitos para os tecidos. As primeiras interações que acontecem são entre açúcares presentes na superfície dos leucócitos com selectinas na superfície do endotélio ativado; essa ligação inicial é considerada fraca e tem como objetivo induzir o rolamento/margeamento dos leucócitos pelos vasos sanguíneos (Vestweber e Blanks, 2000). Ao rolar sob o endotélio, os leucócitos entram em contato com quimiocinas produzidas pelo tecido comprometido, resultando na ativação de integrinas presentes na superfície dos leucócitos, que leva a uma ligação de alta afinidade (Johnston e Butcher, 2002). As integrinas ativadas se ligam aos seus ligantes da superfamília de imunoglobulinas nas células endoteliais, mediando a adesão firme dos leucócitos. Em paralelo, a expressão de seus ligantes nas células endoteliais é regulada positivamente por citocinas inflamatórias nos locais de infecção. Esses ligantes incluem VCAM-1, que se liga a integrina VCLA-4 e ICAM-1 (moléculas de adesão intercelular), que se liga às integrinas LFA-1 e Mac-1 (Vestweber, 2003). Assim, os leucócitos se ligam firmemente ao endotélio, seu citoesqueleto é reorganizado e eles se espalham pela superfície endotelial (Vestweber, 2002). Em seguida, as células passam por junções entre as células endoteliais e migram através da parede vascular, na etapa de transmigração paracelular; esse processo só ocorre graças ao aumento da permeabilidade vascular, permitindo que os leucócitos deixem a corrente sanguínea e alcancem os tecidos extravasculares (Winger *et al*, 2014). Além disso, ocorrem outros eventos vasculares, incluindo a vasodilatação, o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade das vênulas pós-capilares, com a exsudação de líquidos. Essa vasodilatação é induzida por mediadores, incluindo aminas vasoativas, histamina, prostaglandina (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e leucotrienos, produzidos pela presença de células danificadas.

Correlacionando esses eventos fisiológicos aos cinco sinais cardinais da inflamação, a dor está relacionada com a produção de PGE<sub>2</sub> e mediadores como a bradicinina e IL-1, levando a hipersensibilização dos aferentes dolorosos, ou seja, as terminações nervosas que transmitem a dor são estimuladas por esses mediadores químicos, que em última análise, reduzem o limiar da dor (Kawabata, 2011; Kawahara *et al*, 2015). A perda de função pode ocorrer seja pelo edema e dor no local inflamado, como pela substituição de tecido saudável por tecido cicatrizante, o que também levaria a uma perda de função do órgão em questão (Tang e Wang, 2018). O edema reflete o aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares devido ao extravasamento celular de proteínas e exsudato, induzido pela produção de leucotrienos, enquanto rubor e calor são decorrentes não só da vasodilatação, mas também do aumento do fluxo sanguíneo na região, levando a um aumento de eritrócitos e a elevação da temperatura local (Kawahara *et al*, 2015). Esse aumento de temperatura também pode ocorrer de forma sistêmica, processo conhecido como febre (Abbas, Lichtman e Pilai, 8ed; Rang *et al*, 8ed; Kamei e Carman, 2010; Filippi, 2016).

## **1.2. Febre – fisiologia e pirógenos**

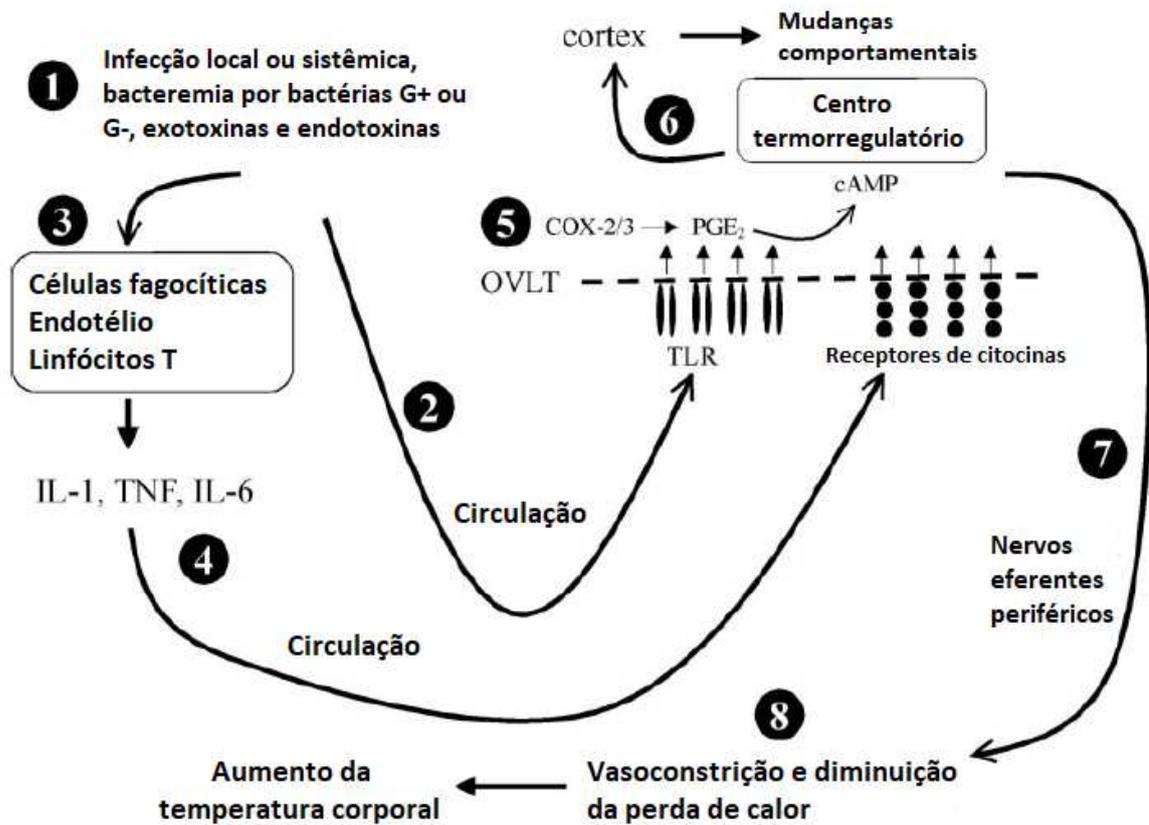
Em humanos, a temperatura corporal varia entre 36,0° C e 37,0° C, sendo que a manutenção da temperatura corporal estável e constante é um aspecto crítico no processo de homeostase, uma vez que todos os processos químicos e biológicos são excepcionalmente dependentes da temperatura (Mackowiak, Wasserman e Levine, 1992; Baker *et al*, 2001; Geneva *et al*, 2019). Podem haver dois motivos principais para que ocorra mudança de temperatura no corpo: a febre e a hipertermia, sendo o primeiro caracterizado como um aumento da temperatura corporal a partir de um estímulo regulatório sofrido no hipotálamo, causado por infecção ou inflamação, enquanto que a hipertermia é causada pelo aumento da temperatura corporal em resposta a produção de calor pelas próprias células do corpo, como ocorre na prática de exercícios físicos, não havendo relação com estímulos termorregulatórios no hipotálamo (Blatteis, 2010; Ogoina, 2011). Diferentes estágios de febre também variam em humanos de acordo com a fonte, embora as temperaturas que caracterizam a febre sejam definidas como aquelas iguais ou superiores a 37,8° C (0,8°C acima da variação na homeostase), entre 37,3°C e 37,8° C temos o estado febril, um estágio que marca o aumento da temperatura corporal, mas ainda não representa a febre (O'Grady *et al*, 2008). Além disso, o controle térmico representa um grande gasto energético para o corpo e ainda assim a febre foi mantida ao longo de toda a evolução dos seres vertebrados, reforçando seu papel na sobrevivência adaptativa desses animais (Kluger *et al*, 1996). Devido a essa dualidade, muito

ainda é questionado sobre a importância desse fenômeno. Duas linhas de ideias principais surgem para tentar explicar esses benefícios: a primeira aponta que a maioria dos microrganismos perde sua virulência ou são mortos em temperaturas febris, e a segunda defende uma melhora efetiva na atuação do sistema imunológico em temperaturas mais elevadas. Um exemplo desse cenário proposto, pode ser visto tanto em infecções bacterianas, quanto em infecções virais. Isso se deve ao fato de que algumas bactérias precisam extrair ferro do ambiente para crescer e se replicar, como ocorre na espécie *Salmonella typhimurium*. Para que isso aconteça, elas secretam moléculas que tenham afinidade com o ferro, chamadas sideróforos. Eles se ligam às moléculas de ferro, e são incorporados pelas enzimas e estruturas bacterianas. A produção de sideróforos é dependente da temperatura, tendo supressão quase total a 40° C, evidenciando a importância do processo febril em casos de infecção bacteriana. (Garibaldi, 1972; Pieracci e Barie, 2005; Weiss, 2005; Cannon, 2013). Já no caso dos vírus, foi visto que o estado de pirexia implica diretamente em vários estágios da sua replicação. A temperatura parece afetar a entrada dos vírus nas células, afetando a fluidez das membranas celulares e no processo de endocitose, levando a diminuição da eficácia da transcrição do genoma viral, causando instabilidade no complexo gênico, e aumento da resposta de células T CD8+, estimulando seu efeito citotóxico na detecção e eliminação viral. (Thorne *et al*, 2005; Belon *et al*, 2021).

Em 1888, a febre ganhou uma definição pelo bacteriologista William H. Welch: “O verdadeiro inimigo na maioria dos processos febris são as substâncias nocivas que invadem o corpo, e não há nada que nos impeça de acreditar que a febre é uma arma da natureza para combater os danos desses inimigos. Assim, os agentes produtores da febre acendem o fogo que os consome”. Hoje, a febre ainda deixa cientistas intrigados e suas raízes biológicas e evolutivas ainda são estudadas (Welch e Thayer, 1897; Cannon, 2023). A indução e manutenção da febre durante um processo inflamatório ou infeccioso envolve uma correlação única e coordenada entre o sistema imunológico inato e o sistema nervoso central e periférico, a partir de mudanças no centro de termorregulação no hipotálamo (Evans, Repasky e Fisher, 2015). Os estímulos para o desenvolvimento de um processo febril podem ocorrer de diferentes formas, sejam eles infecciosos ou não, externos ou internos, através de moléculas conhecidas como pirógenos (Launey *et al*, 2011). Pirógenos são divididos em duas categorias principais: aqueles originados fora do corpo, chamados de pirógenos exógenos, e aqueles resultantes das próprias células corporais, chamados de pirógenos endógenos ou citocinas pirogênicas, como a IL-1, TNF, IL-6 e IL-12. Já os pirógenos exógenos, são todos aqueles derivados de microrganismos, como toxinas ou produtos celulares, que por sua vez,

estimulam os sistemas imunológicos inato e adaptativo a produzirem os pirógenos endógenos (Micklenberg e Snyderman, 1971; Dinarello, 1997; Mackowiak, 1998).

Essas moléculas têm a capacidade de causar febre graças a um grupo de receptores presentes principalmente em células endoteliais, do sistema imunológico inato e presentes em linfócitos B, denominados PRRs, incluindo os Receptores do Tipo *Toll* (TLRs), capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs (Broz e Monack, 2013). Durante a febre, a ativação desses receptores, a partir do reconhecimento de patógenos, juntamente a células do sistema imunológico inato, inicia uma cascata de sinalização até o hipotálamo, estimulada pela produção de COX-2, PGE<sub>2</sub> e respostas fisiológicas que levam ao aumento da temperatura corporal, como a vasoconstrição periférica (Kawahara *et al*, 2015). Além disso, a produção intermediária de pirógenos endógenos durante as infecções por moléculas exógenas também explica essa propriedade de microrganismos com características físico-químicas distintas, de dispararem a mesma reação biológica. Independente da natureza do patógeno, seus PAMPs serão reconhecidos por PRRs, como os TLRs, haverá um estímulo para a produção de citocinas pirogênicas, e o centro termorregulatório no hipotálamo será ativado, levando ao aumento da temperatura corporal na tentativa de eliminação do patógeno e resolução do processo inflamatório (Netea, Kullberg e Van der Meer, 1999). Por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS) é reconhecido pelo complexo TLR4, lipopeptídeos bacterianos e peptideoglicanas são reconhecidos pelo heterodímero TLR2/TLR1 e TLR2/TLR6, ao passo que ácidos nucleicos, como o material genético bacteriano ou RNA viral pode ser facilmente reconhecido internamente por TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, que são expressos no fagossomo das células fagocíticas (Medzhitov, 2001; Kumar, Kawai e Akira, 2009). Além disso, receptores intracelulares também apresentam um papel fundamental no reconhecimento de patógenos, como os receptores do tipo NOD (NLRs) e os receptores do tipo RIG-1 (RLRs) (Hirayama, Lida e Nakase, 2017; Kwai e Akira, 2011).



**Figura 1.** Caminhos da febre em infecções bacterianas. A partir da entrada de pirógenos endógenos (1), temos seu reconhecimento por TLRs presentes em células fagocíticas, endoteliais e linfócitos T (2, 3). Esse reconhecimento é responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF e IL-6, que regulam positivamente as enzimas ciclooxigenase 2 e 3, produtoras de prostaglandina E<sub>2</sub> (4, 5). Essa prostaglandina E<sub>2</sub> chega até o centro termorregulatório do corpo, localizado no hipotálamo e induz mudanças comportamentais para a elevação da temperatura corporal interna (6). Nervos eferentes periféricos são induzidos a realizar vasoconstrição (7), de forma a evitar a perda de calor para o ambiente e elevar a temperatura corporal interna, juntamente de outros mecanismos fisiológicos (8). Adaptado de: Dinarello, 2004.

A infecção por patógenos pode ocorrer de maneira local ou sistêmica, nas quais bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas liberam seu conteúdo intracelular ou fragmentos de suas paredes celulares, como endotoxinas (LPS), peptidoglicanas e ácido lipoteicóico (Hersh, Weiss e Zychlinsky, 1998). Após invadirem o organismo e alcançarem a circulação sanguínea, como ocorre em pneumonias por *Staphylococcus aureus*, por exemplo, a bactéria e produtos microbianos percorrem todo o corpo, alcançando os pulmões e, muitas vezes, o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) localizado no hipotálamo. O endotélio presente nessa região, expressa uma série de TLRs, que podem ser ativados por PAMPs, com consequente ativação do endotélio. Paralelamente, esses mesmos produtos microbianos também estimulam células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos. Nesse contato,

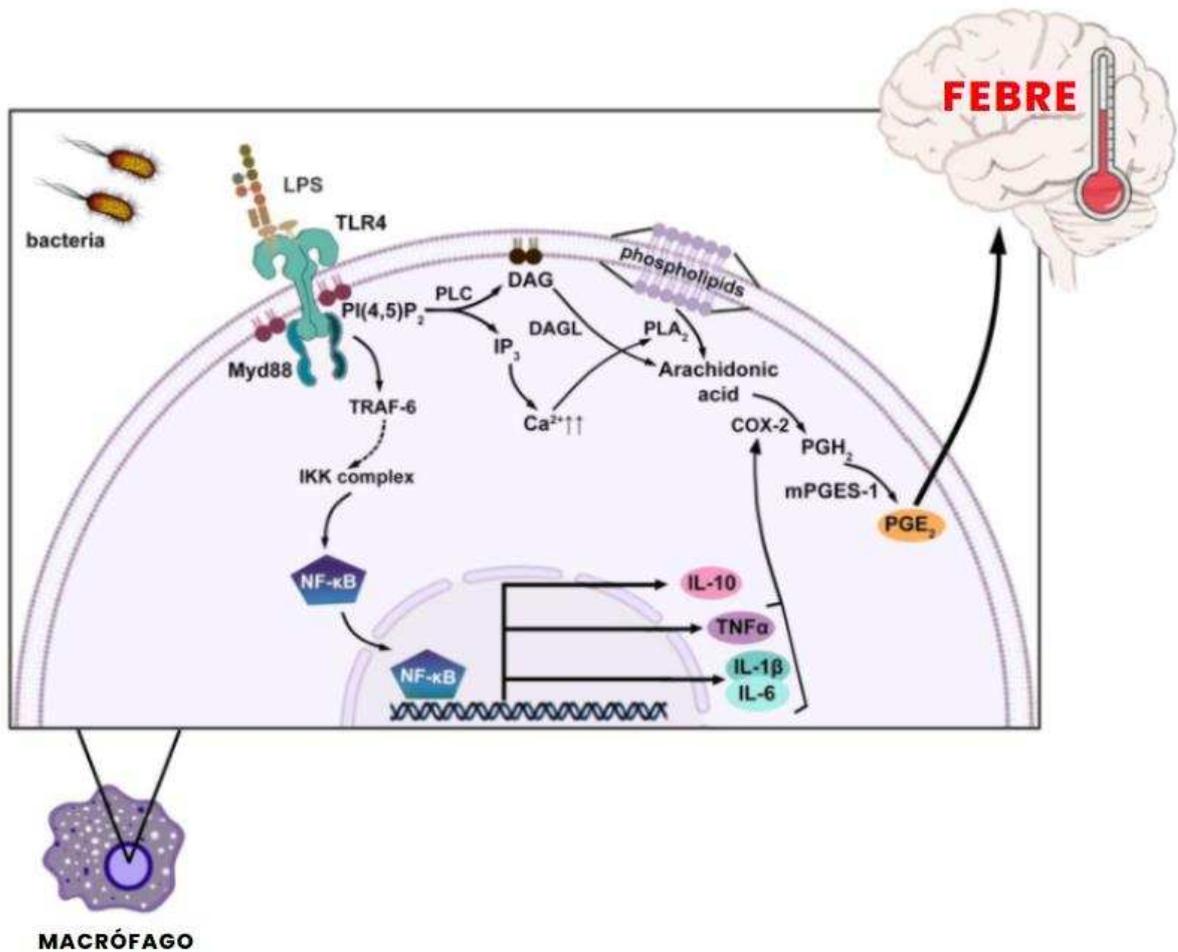
citocinas pirogênicas, majoritariamente IL-1, TNF e IL-6 são sintetizadas, processadas e liberadas na circulação, por onde percorrem até encontrarem seus respectivos ligantes no OVLT (Netea, Kullberg e Van der Meer, 1999). A partir da ativação dos receptores de citocinas no hipotálamo, é induzida a ativação de COX-2, enzima responsável pela oxidação do ácido araquidônico, resultando na síntese de PGE<sub>2</sub> que alcança a parte cerebral do OVLT (os receptores localizam-se na parte endotelial). Esse aumento de prostaglandina cerebral também estimula a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e outros neurotransmissores, que atuam estimulando neurônios termossensíveis no centro de termorregulação do corpo, a fim de elevar o ponto de ajuste termostático hipotalâmico (Bleich, *et al*, 1978). Sinais neuronais recebidos no córtex iniciam mudanças comportamentais nos humanos, que visam conservar o calor corporal, como a mudança de postura e a percepção de frio, por exemplo (Saper e Breder, 1994). Com isso, sinais hipotalâmicos ativam nervos eferentes periféricos para os vasos sanguíneos através do sistema nervoso simpático. Ao mesmo tempo, inicia-se a sinalização por acetilcolina que estimula a contração involuntária de vários músculos do corpo (calafrios), convertendo a energia química em energia térmica, e há liberação de noradrenalina que aumenta a termogênese no tecido adiposo marrom e induz a vasoconstrição da circulação periférica, diminuindo a perda passiva de calor para o ambiente, que leva ao aumento da temperatura corporal (Rubin, 1985; Sneed, 1995; Cannon *et al*, 1996). Esse aumento da temperatura é detectado pelo centro hipotalâmico, que mantém os mecanismos de conservação de calor e alterações comportamentais até que os níveis de PGE<sub>2</sub> caiam (como resultado de inibidores de COX-2 e 3). Alternativamente, a síntese de COX-2 diminui à medida que há ausência de citocinas ou sinais dirigidos por TLRs no nível dos receptores OVLT. Como os TLRs sinalizam pelas mesmas vias intracelulares assim como os receptores de IL-1, por exemplo, os domínios extracelulares vinculam os produtos microbianos e a biologia das citocinas em mamíferos de uma forma que amplia os mecanismos pelos quais o hospedeiro pode aumentar a temperatura corporal em resposta a infecção (Atkins, 1960; Dinarello, 2004) (**Figura 1**).

### **1.3. Febre e o sistema imunológico**

A febre (calor) está tão intimamente relacionada com a resposta inflamatória, que representa um dos cinco sinais cardinais da inflamação, acompanhada da dor, rubor, edema e perda de função. Dito isso, a febre é uma reação fisiológica comum gerada em resposta a presença, na corrente sanguínea, de pirógenos endógenos, sendo estes, os principais mediadores da resposta febril pirogênica (Mackowiak, 1998). Como em qualquer situação de

inflamação, as primeiras células a serem recrutadas são as células do sistema imunológico inato, e durante a febre não é diferente. Temperaturas febris estimulam a liberação de neutrófilos da medula óssea através da produção de fatores estimulatórios da colônia de granulócitos (G-CSF), melhoram a capacidade fagocítica de macrófagos e células dendríticas (DCs), aumentando o poder responsivo dessas células, que sofrem uma hiper-regulação de receptores TLR2 e TLR4 (Ostberg, Ertel e Lanphere, 2005), e ainda são responsáveis pelo aumento da migração de linfócitos T para tecidos linfoides secundários, aumentando as interações adesivas, dependentes da L-selectina, entre os linfócitos circulantes e as vênulas endoteliais superiores (HEV) especializadas (Evans *et al*, 2001). Apesar de terem seu poder fagocítico melhorado, DCs passam a expressar moléculas de MHC de classe I e classe II e fatores co-estimulatórios, como CD80 e CD86, essenciais na apresentação de antígenos para as células do sistema imunológico adaptativo, como células T auxiliares (Th). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias liberadas pelo aumento da temperatura corporal atuam de forma imunomoduladora tanto na imunidade inata, quanto na adaptativa, pelo aumento significativo do recrutamento de linfócitos para os órgãos linfoides para uma resposta imunológica mais efetiva (Soehnlein e Lindbom, 2010; Evans, Repasky e Fisher, 2015).

Em macrófagos, por exemplo, estudos demonstraram que o aumento da temperatura corporal para 39.5° C aumentou significativamente a capacidade de eliminação bacteriana, juntamente com os níveis de IL-1, IL-6 e TNF em camundongos tratados com LPS. Posteriormente, Lee e colaboradores demonstraram que a hipertermia induz a hiper-regulação de proteínas gênicas HSP70, sustentando a reprogramação de macrófagos para estarem altamente responsivos aos estímulos com LPS. Embora, seja uma proteína expressa no meio intracelular, o estresse induzido pelo aumento da temperatura pode levar a secreção de HSP70 no meio extracelular, podendo ser reconhecida como um DAMP, estimulando macrófagos e DCs (Jiang *et al*, 1999; Ostberg, Taylor e Baumann, 2000; Lee *et al*, 2012; Evans, Repasky e Fisher, 2015). Além disso, também se mostra necessária para estimular a produção de óxido nítrico e induzir a óxido nítrico sintase por macrófagos peritoneais após a exposição a temperaturas febris, juntamente com o LPS e IFN- $\gamma$  (Evans, Repasky e Fisher, 2015). Um determinante crucial para a geração da imunidade adaptativa é a alta concentração de linfócitos trafegando entre os órgãos linfoides. A partir do tratamento de células B e T *ex vivo*, estudos identificaram que a temperatura de 39,5° C teria capacidade de controlar esse influxo linfocitário, aumentando a capacidade de ligação entre linfócitos e vênulas endoteliais altas (HEV) – responsáveis pela entrada de linfócitos B e T nos linfonodos e na Placa de Peyer – (Evans *et al*, 2001).



**Figura 2.** Reconhecimento do LPS por TLR4 e produção de prostaglandina por macrófagos. Adaptado de Wrotek *et al*, 2020.

Em macrófagos, o LPS liberado por bactérias Gram negativas é reconhecido por TLR4, e o sinal é transmitido através da família de quinases TRAF6 e IKK, que induzem a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6. Essa ativação de TLR4 também é responsável pela hidrólise de fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) pela ação da fosfolipase C (PLC). Diacilglicerol lipase (DAGL) hidrolisa o diacilglicerol (DAG) presente na membrana plasmática, formando ácido araquidônico livre (AA). Nesse momento, IP<sub>3</sub> estimula a liberação de cálcio no citoplasma pelo retículo endoplasmático, que leva a ativação da fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) para a captação do ácido araquidônico derivado da membrana fosfolipídica. Em seguida, o AA é metabolizado pela COX-2 em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Imediatamente, a prostaglandina microsossomal sintase E2 (mPGES-1) faz a conversão de PGH<sub>2</sub> em PGE<sub>2</sub>, a mesma molécula mediadora de febre que será produzida no hipotálamo. (Wrotek *et al*, 2020) (**Figura 2**).

#### 1.4. Macrófagos e o sistema imunológico

Macrófagos são células do sistema imunológico inato com capacidade fagocítica que desempenham funções ímpares no controle da homeostase, incluindo a remoção de células apoptóticas e reparo tecidual (Bosurgi *et al*, 2017; Hyrayama, Lida e Nakaze, 2017). Os macrófagos podem ser originados a partir de precursores no saco vitelínico, fígado fetal e a partir de monócitos. Essas células estão distribuídas em vários tecidos e recebem nomes de acordo com essa localização, como por exemplo: macrófagos peritoneais localizados no peritônio, macrófagos alveolares nos pulmões, macrófagos intestinais no intestino, microglia no sistema nervoso central, osteoclastos nos ossos, células de Kupffer no fígado e células de Langerhans na epiderme (Gautier *et al*, 2012; Davies *et al*, 2013). Os macrófagos residentes são células-chave no desenvolvimento tecidual, na linha de frente na defesa de tecidos, através da geração e resolução de inflamações, no monitoramento de transformações teciduais e na remoção de células senescentes e apoptóticas, garantindo a homeostase (Cailhier, 2005; Davies, 2013). Macrófagos foram inicialmente descritos em 1883 por Élie Metchnikoff, através de observações microscópicas de células móveis com capacidade de “comer outras células”, evidenciando o conceito de células fagocíticas (Metchnikoff, 1892, Ross, Devitt e Johnson, 2021). O sistema mononuclear fagocitário (SMF) é o responsável por grande parte da imunidade celular, eliminação de células mortas, inflamação e defesa contra patógenos, tanto na eliminação direta de agentes externos, quanto na organização de cada fase do processo inflamatório. Células do SMF incluem os macrófagos e monócitos, estas últimas, produzidas na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas e lançadas na corrente sanguínea, com potencial migração para os tecidos e diferenciação em macrófagos ou DCs (van Furth e Cohn, 1968; Akashi *et al*, 2000; Vasconcellos *et al*, 2003; Fogg, 2006; Italiani e Boraschi, 2014). Além da corrente sanguínea, os monócitos também circulam na medula óssea e baço, constituindo aproximadamente 10% do total de leucócitos em humanos (Stanfield e Ingram, 2015).

Os macrófagos derivados de monócitos podem ser tecido-residentes ou recrutados por insultos inflamatórios (Enzan, 1986; Migliaccio *et al*, 1986; Tavian e Péault, 2005). Estudos recentes mostram que durante uma inflamação aguda, diferentes populações teciduais de macrófagos, os residentes e os derivados de monócitos recrutados, são as primeiras células responsáveis pelo reconhecimento de patógenos ou dano tecidual, respondendo a esses insultos com o recrutamento de mais monócitos, que sofrerão diferenciação em macrófagos inflamatórios (fenótipo M1), que representam a população majoritária no sítio de infecção.

Além do recrutamento de monócitos que se diferenciam em macrófagos inflamatórios, há também aumento da proliferação dos macrófagos residentes, através do estímulo de sua capacidade autorregenerativa (Lech, 2012; Lech, 2012; Italiani e Boraschi, 2014; Ifrim *et al*, 2014).

Devido a sua plasticidade e a fatores do microambiente local, os macrófagos podem adquirir diferentes estados de ativação funcional, assim como estabelecer respostas imunológicas que vão variar de acordo com os estímulos recebidos (Gordon e Taylor, 2005; Geissman *et al*, 2010). Em um contexto inflamatório, os macrófagos podem atuar na promoção da inflamação em resposta a dano tecidual ou a invasão por patógenos, por exemplo; enquanto outra subpopulação de macrófagos pode ser recrutada para a promoção do reparo tecidual. Essa dinâmica entre os diferentes tipos de ativação dessas células, coloca-as no centro do processo inflamatório (Ross, Devitt, e Johnson, 2021). Essa plasticidade é fenotipicamente definida como os dois principais estados de ativação dos macrófagos: macrófagos M1, classicamente ativados, e macrófagos M2, alternativamente ativados. Os macrófagos M1 são caracterizados pela produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, IL-1 $\beta$ , espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), que apresentam forte capacidade tumoricida e microbicida pela robusta atividade fagocítica e citotóxica. Macrófagos M1 regulam positivamente a expressão de moléculas MHC de classe II, moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, e quimiocinas, aumentando o recrutamento de outras células imunológicas para o sítio de infecção (Gordon e Taylor, 2005; Italiani e Boraschi, 2014; Yunna *et al*, 2020; Ross, Devitt, e Johnson, 2021). Os macrófagos M1 são células responsáveis pela resposta imunológica contra fungos, bactérias, vírus e protozoários (Murray e Wynn, 2011). Paralelamente, macrófagos M2, alternativamente ativados, são extremamente importantes na resolução da inflamação e no reparo tecidual, expressando em sua superfície marcadores como CD36, receptor de manose (CD206) e CCL17, e produzindo citocinas tais como, IL-10, fator de crescimento tecidual  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e glicocorticóides (Gordon, 2003; Italiani e Boraschi, 2014; Yunna *et al*, 2020; Ross, Devitt, e Johnson, 2021). Comparado ao perfil M1, macrófagos M2 são funcionalmente diversos, com diferentes subtipos (M2a, M2b, M2c e M2d), cada um expressando diferentes combinações de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Liu *et al*, 2014). Uma das principais diferenças entre os dois estados de polarização é a mudança no metabolismo celular, passando da arginina para a ornitina e poliamina, que ocorre em macrófagos M2, enquanto macrófagos M1 tem essa mudança para a citrulina e produção de NO (Mills, 2000).

A produção de ornitina por macrófagos M2, promove a proliferação celular e o reparo tecidual, juntamente da poliamina e síntese de colágeno, ao passo que o NO presente em macrófagos M1, apresenta um importante papel microbicida e a capacidade de impedir a proliferação celular (Italiani e Boraschi, 2014; Pesce *et al*, 2009; MacMicking, Xie e Nathan, 1997).

Em condições homeostáticas, os macrófagos participam dos processos de imunovigilância, imunossupressão, ou seja, mantém o equilíbrio imunológico sem a necessidade de iniciar um processo inflamatório danoso para o corpo (Okabe e Medzhitov, 2016). Porém, frente a uma infecção, ou seja, quando essa integridade é quebrada e há um desbalanço, monócitos presentes na circulação sanguínea são recrutados para o local e se diferenciam em macrófagos, mantendo um status homeostático com os macrófagos já residentes do tecido afetado (Shi e Pamer, 2011). Ao serem expostos ao LPS, presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, por exemplo, macrófagos liberam inicialmente IFN- $\gamma$  e TNF, que tem a capacidade de ativá-los para um perfil pró-inflamatório durante os estágios iniciais da infecção bacteriana, como uma tentativa de contenção de danos (Martinez, 2008). Os PRRs presentes nas células do sistema imunológico inato, principalmente macrófagos, reconhecem o LPS como por exemplo, por meio de TLR4, o que induz a secreção de mais TNF, metabólitos e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e NO, por exemplo, que tem como função a eliminação do patógeno e a ativação do sistema imunológico adaptativo. Após essa inflamação aguda inicial causada pela infecção, muitos macrófagos fenotipicamente M1, sofrem apoptose ou recebem novos estímulos e são polarizados para o perfil M2, a fim de proteger o hospedeiro contra uma resposta inflamatória exacerbada (tempestade de citocinas) e promover a volta da homeostase (Fujiwara e Kobayashi, 2005; Murray e Wynn, 2011; Mokarram e Bellamkonda, 2013; Liu, 2014).

Além do reconhecimento de patógenos e moléculas exógenas, os macrófagos também participam de processos intrínsecos do metabolismo que ocorrem a todo momento, como a remoção de células apoptóticas, processo denominado eferocitose. Células apoptóticas são geradas durante a homeostase, como, por exemplo, em diferentes fases do desenvolvimento embrionário, e ainda em resposta a infecções. A remoção dessas células é essencial para a manutenção da homeostase, uma vez que, não sendo removidas, essas células apoptóticas podem iniciar processos de necrose secundária, com liberação de DAMPs, possivelmente levando a um foco inflamatório. A eficiência da eferocitose é marcada por três principais sinais: “*find-me*” (sinalizadores químicos são liberados para o recrutamento de células

fagocíticas até as células apoptóticas), “*eat-me*” (reconhecimento e fagocitose das células apoptóticas por fagócitos mediada por receptores), e sinais pós-fagocitose, que regulam positivamente os fagolisossomos para a digestão do material fagocitado. (Nagata, Hanayama e Kawane, 2010; Kono e Rock, 2008; Silva, 2010; Galluzzi *et al*, 2014; Elliot, Koster e Murphy, 2017). Sinais “*find-me*” incluem a produção de fatores solúveis quimio-atrativos para estimular a quimiotaxia dos macrófagos até a célula apoptótica; fatores esses que incluem: a quimiocina CXCL1, nucleotídeos trifosfatados (ATP) e sinais lipídicos como a lisofosfatidilcolina (lysoPC) (Lauber *et al*, 2003; Truman *et al*, 2008; Elliott *et al*, 2009; Elliot, Koster e Murphy, 2017). O reconhecimento dessa célula pelo macrófago é mediado, principalmente, via altos níveis de fosfatidilserina (PtdSer) na superfície celular, uma vez que este fosfolípido é encontrado majoritariamente, em células saudáveis recobrando a membrana plasmática no meio intracelular (Segawa e Nagata, 2015; Elliot, Koster e Murphy, 2017). Após o reconhecimento e eferocitose da célula apoptótica, macrófagos adquirem uma grande carga de material celular, como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Dessa forma, os sinais pós fagocitose tem como função aumentar o metabolismo desse macrófago, de forma a iniciar a degradação e os caminhos de efluxo (Han e Ravichandran, 2011; Elliot, Koster e Murphy, 2017).

## 2. JUSTIFICATIVA

A febre é uma resposta fisiológica evolutivamente conservada que confere benefícios de sobrevivência durante infecções, através do controle da proliferação microbiana e otimização do funcionamento do sistema imunológico, com uma melhora efetiva no processo de fagocitose, na mobilidade de células polimorfonucleares e prevenção da redução do *pool* de linfócitos. Trata-se de um sinal cardinal da inflamação de característica aguda e muitas vezes autorresolutiva. No entanto, se prolongada, pode ter efeitos deletérios no organismo. Compreender os mecanismos pelos quais o estresse térmico na faixa da febre amplifica ou prejudica as funções de macrófagos durante infecções e inflamações é importante para o desenvolvimento de terapias que modulem as variações de temperatura em fases distintas, para otimizar a eliminação de patógenos e o controle da homeostase. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura (37°C e 39°C) na modulação de macrófagos *in vitro*. Espera-se encontrar uma regulação positiva da capacidade inflamatória, uma vez que, no organismo, a febre acontece como um mecanismo benéfico para o sistema imunológico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da temperatura na modulação funcional de macrófagos *in vitro*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- a. Investigar o potencial fagocítico e microbicida de macrófagos de linhagem RAW 264.7 pré-estimulados ou não com LPS e infectados com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* à 37°C e à 39°C;
- b. Avaliar a produção de óxido nítrico de macrófagos de linhagem RAW 264.7 pré-estimulados ou não com LPS à 37°C e à 39°C;
- c. Caracterizar o perfil de citocinas liberadas pelos macrófagos de linhagem RAW 264.7 pré-estimulados ou não com LPS à 37°C e à 39°C.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Bactéria**

A bactéria *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, foi cedida pela Prof. Dra. Tatiana Pinto, (IMPG/UFRJ). A amostra está sendo mantida no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  em meio *skin milk* contendo 10% de glicerol. Para sua ativação, foi realizado o cultivo em ágar sangue (Plastlabor) e incubação em estufa à  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por até 18 horas. Após esse processo, foi realizado um novo repique em ágar sangue para os experimentos de infecção de macrófagos de linhagem RAW 264.7.

### **4.2. Preparação e padronização do inóculo**

Para a preparação do inóculo, as colônias bacterianas foram coletadas e adicionadas em 5 mL de PBS 1X estéril. A densidade óptica da solução foi analisada no espectrofotômetro (Biochrom Ultrospe 7000), com o comprimento de onda de 600 nm. O inóculo foi padronizado por meio de experimentos sucessivos, nos quais correlacionaremos a densidade óptica da solução com a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. pneumoniae*.

### **4.3. Cultura de células RAW 264.7**

Foi utilizada a linhagem de macrófagos RAW 264.7 aderentes, geradas a partir de camundongos C57BL/6J, obtida por doação do professor Célio Freire de Lima do Laboratório de Imunomodulação da UFRJ-Biofísica. Estes foram cultivados em garrafas plásticas, em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) completo (suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM piruvato, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina, aminoácidos não essenciais), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco), e mantidos na estufa a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , em uma atmosfera a 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ . Para o repique das células, o meio de cultura foi coletado e transferido para um tubo de 50 mL e à camada de células foi adicionado meio DMEM completo. A suspensão de células obtida foi transferida para um tubo de 50 mL e centrifugada a 1600 RPM por 6 minutos. O pellet foi ressuspenso em DMEM completo + 10% de SFB, e as células foram contadas na câmara de Neubauer e distribuídas em garrafas de cultivo celular em meio DMEM + 10% de SFB, e mantidas na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  em uma atmosfera a 95% de ar e 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### 4.4. Plaqueamento e pré-estímulo com LPS das células RAW 264.7

As células foram soltas das garrafas de cultivo celular a partir do protocolo de repique. O meio foi removido da garrafa com o auxílio de uma pipeta de vidro e colocado em um tubo Falcon de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de meio DMEM (Gibco) completo (suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM piruvato, 10  $\mu$ g/mL de gentamicina, aminoácidos não essenciais) e foram dadas batidas na garrafa até que todas as células soltassem. Com uma pipeta de vidro, o meio com as células soltas foi removido da garrafa e colocado no Falcon de 50 mL com o meio retirado previamente. Repetiu-se essa etapa 2 vezes. Após a coleta de todas as células, estas, foram centrifugadas a 1600 rpm por 6 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram resuspendidas em 1 mL de DMEM completo. Para a contagem em Câmara de Neubauer, as células foram diluídas na concentração de 1:10 em Trypan 2%, homogeneizadas e contadas. A partir da contagem, as células foram adicionadas em duas placas de cultura celular de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^5$ /poço e foram adicionados 100  $\mu$ L de meio DMEM completo suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) em cada poço. As células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 2h para a aderência. Após esse processo, os meios foram recolhidos dos poços com posterior lavagem com PBS 1X para a remoção de células que não aderiram. Para estimular os macrófagos, foi adicionado 50  $\mu$ L de LPS (Invivogen) na concentração de 500 ng/mL nos respectivos poços, seguido de 50  $\mu$ L de meio DMEM completo suplementado com 10% de SFB. Nos poços sem o estímulo do LPS, foi adicionado apenas 100  $\mu$ L de meio DMEM completo suplementado com 10% de SFB. Cada placa foi colocada em incubadora por 24 horas em diferentes temperaturas; uma placa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e a outra a 39°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.5. Infecção *in vitro* por *Streptococcus pneumoniae*

Após as 24 horas na incubadora, o meio contendo LPS foi retirado dos respectivos poços e foi adicionado o inóculo de *Streptococcus pneumoniae* na MOI 1:10 acrescido de 40  $\mu$ L de meio DMEM completo suplementado com 10% SFB. Nos poços que não receberam a bactéria, foi adicionado apenas meio. As placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e incubadas por 2 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e a 39°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio contendo a bactéria foi retirado dos respectivos poços, e foram adicionados 100  $\mu$ L de Gentamicina [100  $\mu$ g/mL] e Penicilina [10 U] em todos os poços, acompanhado de mais uma incubação por 30 minutos a 37°C e a 39°C, 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.6. Ensaio de capacidade fagocítica

Para avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos de linhagem RAW 264.7, após os 30 minutos de incubação com a Gentamicina e a Penicilina, os poços foram lavados com PBS 1X e ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  da solução de PBS 1X e Triton 0,025% para a lise dos macrófagos. Os lisados foram plaqueados em placas de Ágar sangue (20  $\mu\text{L}$ ), e estas foram incubadas a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  por 24 horas para a posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Alternativamente, os macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro estéreis para a fixação celular, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço, pré-estimulados com LPS e após 24 horas, infectados com *Streptococcus pneumoniae*, seguindo a mesma metodologia descrita acima. Após os 30 minutos de incubação, todos os poços foram lavados com 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X e as lamínulas foram retiradas para a coração com Kit Panótico (Laborclin). Cada lamínula foi submergida 5 vezes em cada reagente e lavada com água destilada para a posterior montagem das lâminas com Entellan (Merck) e observação da morfologia celular por microscópio óptico.

#### 4.7. Ensaio de capacidade microbicida

Para avaliar a capacidade microbicida de macrófagos de linhagem RAW 264.7, após os 30 minutos de incubação com a Gentamicina e a Penicilina, os poços foram lavados com PBS 1X e incubados novamente a 37°C e a 39°C, 5%  $\text{CO}_2$  com DMEM completo suplementado com 10% SFB durante 6 e 24 horas. Após os respectivos períodos, os poços foram novamente lavados com PBS 1X e ressuspensos na solução de PBS 1X e Triton 0,025% para a lise dos macrófagos. Os lisados foram plaqueados em placas de Ágar sangue (20  $\mu\text{L}$ ), e estas foram incubadas a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  por 24 horas para a posterior contagem de UFCs.

#### 4.9. Dosagem de óxido nítrico

O NO produzido pelos macrófagos foi determinado indiretamente através da quantificação de nitrito ( $\text{NO}_2$ ). O sobrenadante obtido nos poços após o tratamento com LPS ou apenas meio DMEM, foi coletado, diluído em uma proporção de 1:1 com o reagente de Griess (composto por 0,1% dihidrocloro de naftiletlenodiamina, 1,0% sulfanamida e 2,5% de ácido fosfórico) e homogeneizado. A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro de placa, com filtro de 540nm. A determinação da concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$ .

#### 4.10. Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes provenientes dos ensaios *in vitro* foram coletados para a dosagem das citocinas TNF, IL-10 e IL-6 pela técnica de ELISA do tipo sanduíche seguindo a metodologia orientada pelo fabricante (BD, BD, Invitrogen). As placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura diluídos em PBS ou tampão de captura (fornecido pelo fabricante) e incubadas a 4° C, ou temperatura ambiente, por 18 horas. A placa foi lavada com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), bloqueada com PBS contendo 10% de SFB por 2 horas à temperatura ambiente seguida de lavagem com PBS-T. Os sobrenadantes e as citocinas recombinantes (curva-padrão) foram adicionados e incubados a 4° C na geladeira por 18 horas. Foi realizada uma nova lavagem com PBS-T, os anticorpos secundários de detecção foram adicionados, marcados com biotina e diluídos em PBS contendo 10% de SFB, e incubada por 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi revelada com peroxidase conjugada à estreptoavidina (eBioscience, EUA) diluída na proporção de 1:250 em PBS contendo 10% de SFB a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após a etapa de lavagem, foi adicionado o substrato da enzima HRP-peroxidase Tetrametilbenzidina (TMB) (eBioscience, EUA). A densidade óptica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa (VERSAMax Microplate Reader, Molecular Devices, EUA), com filtro de 450 nm. As concentrações das citocinas foram calculadas a partir dos valores obtidos da curva padrão de citocinas recombinantes e os resultados expressos em pg/mL, representando a média e erro padrão (SE) das leituras de absorbância das triplicatas de cultura.

#### 4.11. Análise estatística

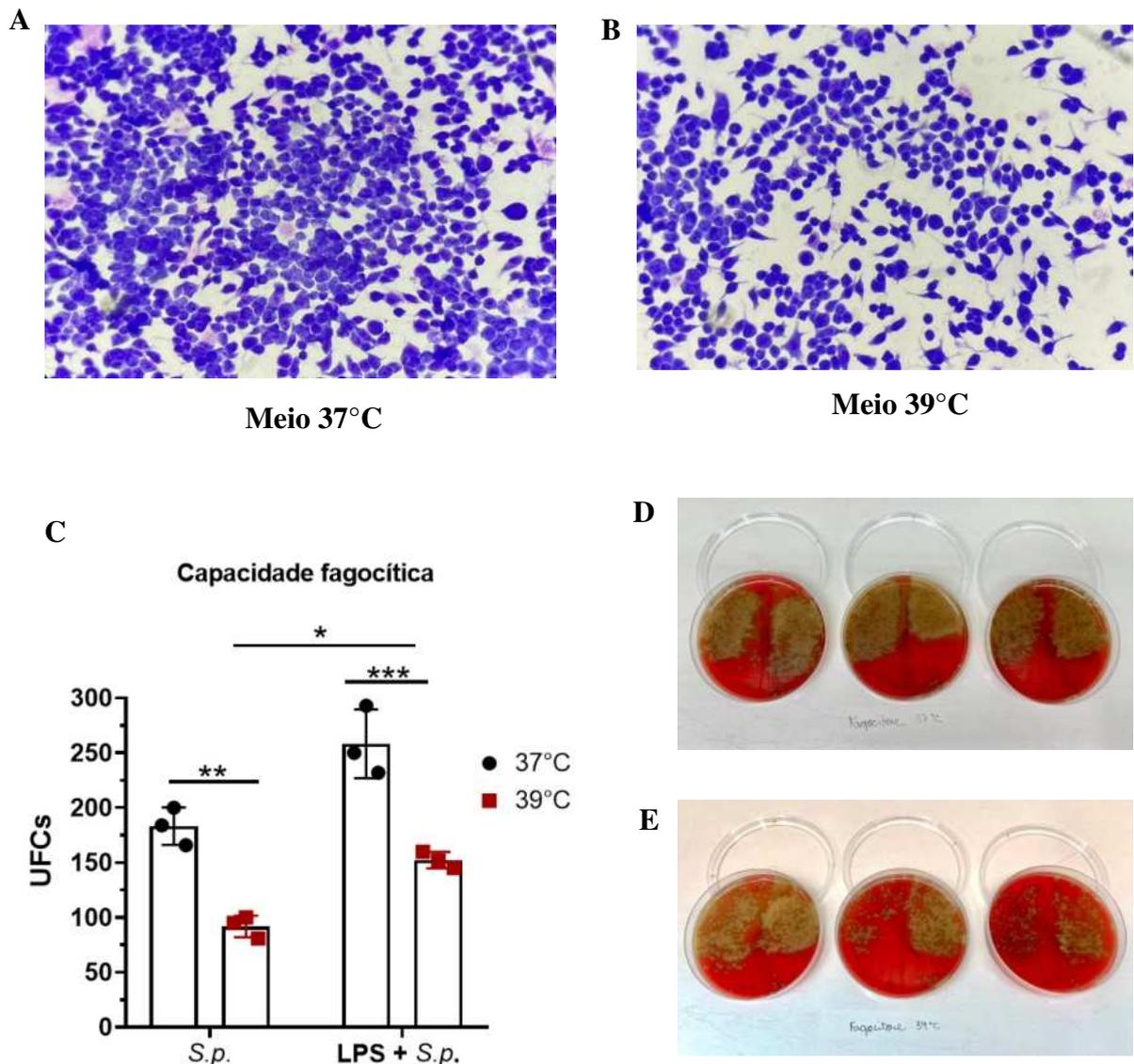
A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism v. 8.0, empregando o teste one-way ANOVA ou teste *t* de Student para as amostras independentes. Diferenças com um valor de  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) foram consideradas significantes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Temperatura elevada diminui a fagocitose de *S. pneumoniae* por macrófagos

Infecções por *S. pneumoniae* comumente estão associadas a um aumento da temperatura corporal que pode ser um importante mecanismo bacteriostático. No entanto, elevadas temperaturas podem alterar o funcionamento de células do sistema imunológico, especialmente macrófagos, que são células responsáveis pela fagocitose de bactérias. Antes de realizar o teste de capacidade fagocítica nas temperaturas de 37 e 39°C, de forma a confirmar que a temperatura de 39°C não afetaria a morfologia das células, plaqueamos macrófagos de linhagem RAW 264.7 em poços contendo lamínulas de vidro em ambas as temperaturas, e depois coramos as lamínulas com Kit Panótico para observação por microscopia. Em nossas observações não observamos diferenças morfológicas entre as células nas diferentes temperaturas (**Figura 4A, B**). Depois, para avaliar o potencial fagocítico desses macrófagos, plaqueamos novamente as células em dois grupos: estimulados ou não com LPS por 24 horas, e posteriormente infectados com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* e então, incubados a 37 e 39°C durante 2 horas. Após esse período de incubação, a bactéria foi retirada e os poços receberam doses de gentamicina [100 µg/mL] e penicilina [10U] para a eliminação das bactérias presentes no meio extracelular. Em seguida, os macrófagos foram lisados com Triton [0,025%] e o cultivo dos lisados foi realizado em placas de Ágar sangue por 24 horas a 37°C para a contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs).

Observamos uma diminuição significativa na contagem de UFCs em ambos os grupos (*S.p.* e LPS + *S.p.*) na temperatura de 39°C, evidenciando uma modulação negativa na atividade fagocítica desses macrófagos em temperaturas elevadas. Embora tenhamos percebido um aumento significativo na capacidade fagocítica do grupo LPS + *S.p.* quando comparado ao grupo *S.p.* na temperatura de 39°C, esse aumento ainda foi significativamente menor quando comparado aos grupos a 37°C (**Figura 4C-E**).

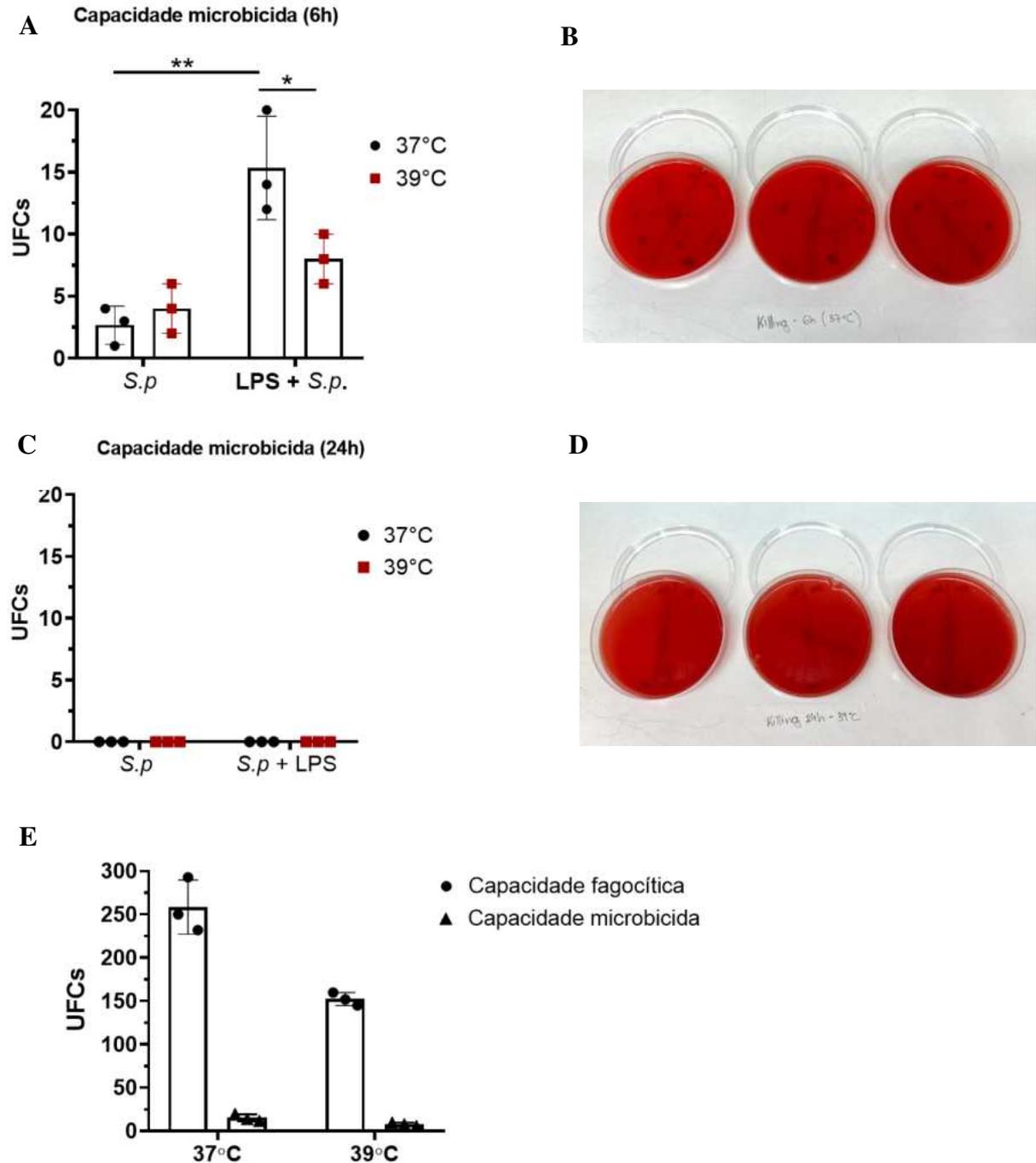


**Figura 4:** Avaliação da morfologia e ensaio de fagocitose em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS e infectados com a bactéria *S. pneumoniae*, incubados a 37° e 39°C. Microscopia de macrófagos de linhagem RAW 264.7 em lamínulas a corados com Kit Panótico para observação da morfologia das células (**A**, **B**). Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados, plaqueados [ $1 \times 10^5$  cels/poço] durante 2h, estimulados com LPS [500 ng/mL] por 24h, infectados com a bactéria gram-positiva *S. pneumoniae* ATCC 49619 [MOI 1:10] e incubados a 37° e 39°C durante 2h. (**C**) Após as 2h, foram adicionadas, por 30 minutos, gentamicina [100 µg/mL] e penicilina [10U] para a eliminação das bactérias do meio extracelular. O ensaio de fagocitose foi realizado a partir da lise de macrófagos [0,025% Triton], cultivo dos lisados em placas de Ágar sangue durante 24h a 37°C e contagem subsequente de unidades formadoras de colônia (UFCs). (**D**, **E**) Fotos representativas das placas de Ágar sangue após o crescimento bacteriano. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido de pós teste de Tukey (\*, \*\* e \*\*\* indicam  $\leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$  e  $\leq 0.001$ , respectivamente).

## 5.2. Temperatura elevada aumenta o potencial microbicida de macrófagos

Para avaliar o potencial microbicida de macrófagos infectados com *S. pneumoniae* a 37°C e 39°C, macrófagos RAW 264.7, foram estimulados ou não com LPS por 24 horas, infectados com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* e incubados a 37° e 39°C durante 2 horas. Após esse período de incubação, a bactéria foi retirada e os poços receberam doses de gentamicina [100 µg/mL] e penicilina [10U] para a eliminação das bactérias presentes no meio extracelular. Seguido desse processo, as células voltaram para a incubadora por mais 6 e 24 horas. Após esses períodos, os macrófagos foram lisados com Triton [0,025%] e o cultivo dos lisados foi realizado em placas de Ágar sangue por 24 horas a 37°C para a contagem subsequente das unidades formadoras de colônia (UFCs).

Nós verificamos que após 6 horas de infecção com a bactéria, houve um aumento do crescimento microbiano em macrófagos do grupo LPS + *S.p.* a 37°C, mas a 39°C, esse crescimento foi significativamente menor (**Figura 5A, B**). No entanto, 24 horas após a infecção, não observamos crescimento microbiano em nenhuma das condições e temperaturas testadas. Nossos dados sugerem que a infecção de macrófagos à 39°C diminui a fagocitose de bactérias, mas aumenta o poder microbicida dessas células observado em até 6 horas após a infecção (**Figura 5C, D**). De forma a tentar relacionar os resultados obtidos em ambos os testes, de capacidade fagocítica e microbicida, os colocamos juntos para melhor observação (**Figura 5E**).

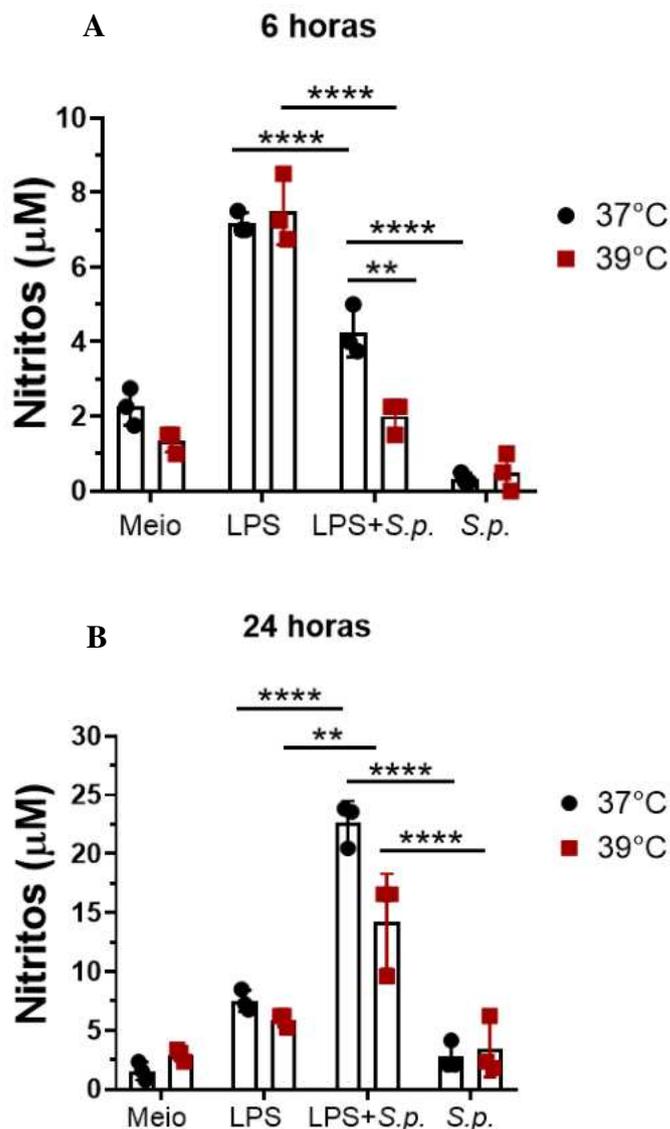


**Figura 5: Análise da atividade microbicida de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS e infectados com a bactéria *S. pneumoniae*, incubados a 37° e 39°C.** Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados, plaqueados durante 2h, estimulados com LPS [500 ng/mL] por 24h, infectados com a bactéria gram-positiva *S. pneumoniae* ATCC 49619 [MOI 1:10] e incubados a 37° e 39°C durante 6h e 24h. Após esse tempo, foram adicionadas, por 30 minutos, gentamicina [100 µg/mL] e penicilina [10U] para a eliminação das bactérias do meio extracelular. A análise da atividade microbicida dos macrófagos (A, C) foi realizada a partir de sua lise [0,025% Triton], cultivo dos lisados em placas de Ágar sangue durante 24h a 37°C e contagem subsequente de unidades formadoras de colônia (UFCs). (B, D) Fotos representativas das placas de Ágar sangue após o crescimento bacteriano. (E) Gráfico comparativo das capacidades fagocíticas e microbicidas nas diferentes temperaturas. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido de pós teste de Tukey (\*, \*\* indicam  $\leq 0,05$  e  $\leq 0,01$ , respectivamente).

### **5.3. Elevação da temperatura regula negativamente a produção de nitritos em macrófagos estimulados com LPS e infectados com a bactéria *S. pneumoniae***

Para investigar os mecanismos que podem aumentar a atividade microbicida de macrófagos, investigamos a produção de nitritos por estas células após infecção por *S. pneumoniae* à 37 e 39°C.

Nós verificamos que após 6 horas de infecção (**Figura 6A**), macrófagos previamente estimulados com LPS (controle positivo) secretaram quantidades significativamente maiores de nitritos em ambas as temperaturas, quando comparados com outros dois grupos: o grupo estimulado com LPS que entrou em contato com a bactéria por 2 horas (LPS+S.p), e o grupo que não foi estimulado com LPS e entrou em contato com a bactéria por 2 horas (S.p.). Além disso, observamos que o aumento da temperatura (39°C), também modulou negativamente a produção de nitritos em macrófagos previamente estimulados com LPS e infectados com *S. pneumoniae* 6 (**Figura 6A**) e 24 (**Figura 6B**) horas após a infecção com *S. pneumoniae*.



**Figura 6.** Análise da produção de óxido nítrico em macrófagos murinos de linhagem RAW (264.7) pós estímulo com lipopolissacarídeo (LPS), incubados a 37° e 39°C. Macrófagos murinos de linhagem RAW 264.7 foram cultivados, plaqueados durante 2h [ $1 \times 10^5$  cels/poço], estimulados com LPS [500 ng/mL] por 24h, infectados com a bactéria gram-positiva *S. pneumoniae* ATCC 49619 [MOI 1:10] e incubados a 37° e 39°C durante 6h e 24h para posterior dosagem de nitritos no sobrenadante da cultura através do Ensaio de Griess (A e B, respectivamente). Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido de pós teste de Tukey (\*\* e \*\*\*\* indicam  $\leq 0.01$  e  $\leq 0.0001$ , respectivamente).

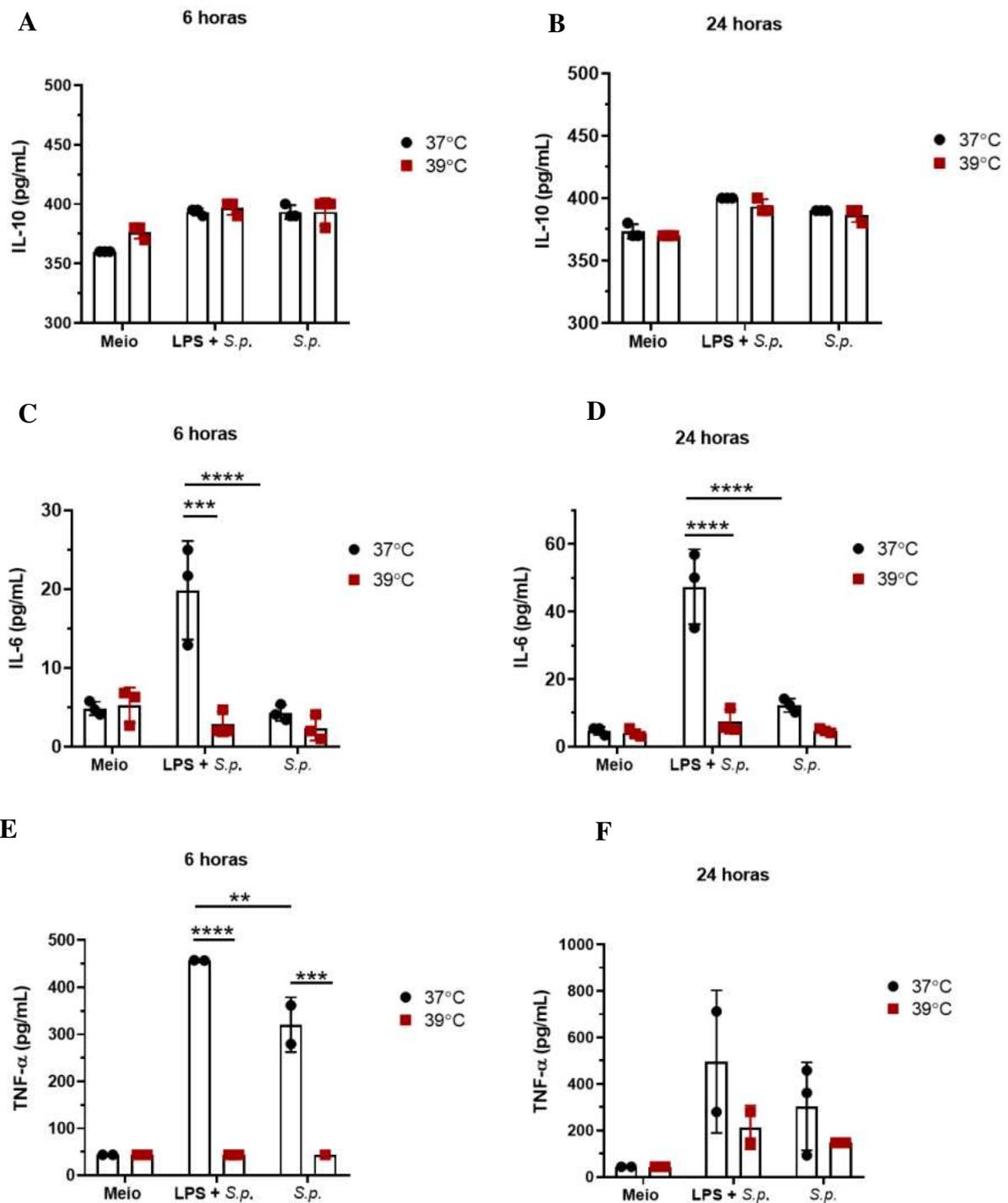
#### 5.4. Elevação da temperatura regula e estímulo com LPS alteram a produção de citocinas da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 incubados a 37 e 39°C

A análise da produção de citocinas foi realizada a fim de elucidar possíveis modulações fenotípicas que esses macrófagos poderiam assumir nas diferentes temperaturas.

Por conta disso, foram dosadas as citocinas IL-10, IL-6 e TNF pelo método de ELISA sanduíche. Ao analisar a IL-10, após 6 e 24 horas (**Figura 7A-B**), não observamos diferenças significativas entre os grupos previamente estimulados o LPS que tinham entrado em contato com a bactéria (LPS + *S.p.*) e o grupo *S.p.* em ambas as temperaturas.

Ao analisar a IL-6 após 6 horas (**Figura 7C**), observamos que o estímulo com LPS e a temperatura de 37°C foram os fatores responsáveis pela produção de altos níveis de IL-6, uma vez que observamos um aumento bastante significativo no grupo LPS + *S.p.* quando comparado a esse mesmo grupo a 39°C, mas não observamos esse aumento em nenhuma das duas temperaturas nos grupos *S.p.*, evidenciando que a temperatura de 37°C, somada ao LPS, foram os estímulos necessários para essa produção de IL-6. Após 24 horas (**Figura 7D**), observamos quase a mesma situação. Apenas o grupo LPS + *S.p.* a 37°C foi capaz de produzir altos níveis de IL-6. Nesse caso, mais do que o dobro da concentração observada na dosagem de 6 horas.

Ao analisar o TNF após 6 horas (**Figura 7E**), observamos um aumento significativo nos grupos LPS + *S.p.* e *S.p.* a 37°C, quando comparados com os mesmos grupos na temperatura de 39°C. Fica evidente que, no tempo de 6 horas, a temperatura mais elevada (39°C) foi responsável por modular negativamente a produção de TNF em ambas as situações de estímulo dos macrófagos, independente do LPS e da bactéria, permanecendo a mesma, em níveis significativamente mais baixos. Já após 24 horas (**Figura 7F**), não observamos mais diferenças significativas entre nenhum dos grupos. Continuamos observando uma maior concentração de TNF nos grupos LPS + *S.p.* e *S.p.* a 37°C, mas quando comparados com o tempo de 6 horas, também observamos um aumento nos mesmos grupos a 39°C.



**Figura 7: Dosagem de citocinas em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS e infectados com a bactéria *S. pneumoniae*, incubados a 37° e 39°C.** Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados, plaqueados [ $1 \times 10^5$  cels/poço] durante 2h, estimulados com LPS [500 ng/mL] por 24h, infectados com a bactéria gram-positiva *S. pneumoniae* ATCC 49619 [MOI 1:10] e incubados a 37° e 39°C durante 2 horas. Após esse tempo, foram adicionadas, por 30 minutos, gentamicina [100 µg/mL] e penicilina [10U] para a eliminação das bactérias do meio extracelular. Foi adicionado meio DMEM + 10% SFB em todos os poços e incubados por 6 e 24 horas a 37° e 39°C. A dosagem de citocinas pelo método de ELISA sanduíche foi realizado após os respectivos períodos de incubação a partir do sobrenadante dos poços. (A-B) Dosagem de IL-10, (C-D) dosagem de IL-6 e (E-F) dosagem de TNF. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA seguido de pós teste de Tukey (\*\*, \*\*\* e \*\*\*\* indicam  $\leq 0.01$ ,  $\leq 0.001$  e  $\leq 0.0001$ , respectivamente).

## 6. DISCUSSÃO

A inflamação e a febre são dois processos inerentes aos organismos. A inflamação, como uma resposta fisiológica a infecções ou danos teciduais, e a febre (calor) como um dos cinco sinais cardinais da inflamação, representando uma melhora efetiva do sistema imunológico em temperaturas mais elevadas (Rather, 1971; Mackowiack, 1998; Evans, Repasky e Fisher, 2015; Cavaillon, 2021). A febre é gerada em resposta a presença, na corrente sanguínea, de pirógenos endógenos, sendo estes, os principais mediadores da resposta febril pirogênica (Mackowiak, 1998). Como em qualquer situação de inflamação, as primeiras células a serem recrutadas são as células do sistema imunológico inato, e durante a febre não é diferente (Ostberg, Ertel e Lanphere, 2005). Nesse contexto, os macrófagos são células do sistema imunológico inato com capacidade fagocítica que desempenham funções ímpares no controle da homeostase, incluindo a remoção de células apoptóticas e reparo tecidual (Bosurgi *et al*, 2017; Hyrayama, Lida e Nakaze, 2017). Devido a sua plasticidade e a fatores do microambiente local, os macrófagos podem adquirir diferentes estados de ativação funcional, assim como estabelecer respostas imunológicas que vão variar de acordo com os estímulos recebidos (Gordon e Taylor, 2005; Geissman *et al*, 2010).

Durante o processo inflamatório, fagócitos são estimulados por substâncias derivadas de patógenos, como o LPS, por exemplo, e por alterações metabólicas e fisiológicas que ocorrem durante a inflamação. O organismo responde a essa inflamação através da secreção de mediadores inflamatórios e sintomas clínicos, como o aumento da temperatura local/corporal (Garami, Steiner e Romanovsky, 2018). Por conta disso, é possível assumir que esse aumento da temperatura corporal é capaz de modular a função fagocítica de macrófagos. Roberts e Steigbigel (1977), desafiaram macrófagos a 37 e 40°C com cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* para a observação do potencial microbicida. Quando comparadas as duas temperaturas, não encontraram diferenças significativas entre elas. Anos depois, Hiruma e Kagawa (1986) analisaram os efeitos da hipertermia no potencial fagocítico e microbicida de células fagocíticas pelo fungo *Sporothrix shenkii*; também incubaram as células a 37 e 40°C por 2 e 4 horas. Não observaram diferenças significativas no potencial fagocítico dessas células, mas o potencial microbicida foi mais elevado na temperatura de 40°C. Recentemente, Djaldetti e Bessler (2015), realizaram testes parecidos com células de sangue humano e observaram um aumento do potencial fagocítico de macrófagos na temperatura de 40 graus, com uma

diminuição no número de células viáveis após 24 horas. Por conta disso, nosso grupo decidiu avaliar os potenciais fagocítico e microbicidas de macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados a 37 e 39°C por 2, 4 e 24 horas com *S. pneumoniae* desafiados ou não com LPS. Ao contrário dos achados anteriores, observamos que o potencial fagocítico (2 horas) desses macrófagos com ou sem o estímulo do LPS é maior na temperatura de 37°C, com uma perda significativa nos grupos incubados a 39°C. Com relação a capacidade microbicida, observamos que com 6 horas de incubação, o grupo sem LPS (*S.p.*) apresentou uma tendência maior de potencial microbicida a 39°C, enquanto na presença do LPS, os macrófagos incubados a 37°C apresentaram capacidade microbicida significativamente maior. Com 24 horas, não houve diferença entre os grupos em ambas as temperaturas; ambos apresentaram 100% de capacidade microbicida. Nossos achados nos levam a inferir que os estímulos dados foram eficientes na ativação desses macrófagos, e que a temperatura elevada atuou como um fator inibitório para o potencial fagocítico dessas células, embora o potencial microbicida tenha apresentado um resultado contrário.

Em um contexto inflamatório, macrófagos podem atuar na promoção da inflamação em resposta ao dano tecidual ou a invasão de patógenos, por exemplo, através da produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF, IL-1 e IL-6, ROS e NO (Gordon e Taylor, 2005; Italiani e Boraschi, 2014; Yunna *et al*, 2020; Ross, Devitt e Johnson, 2021). Estudos demonstraram que ao serem expostos ao LPS, macrófagos liberam IFN- $\gamma$  e TNF, que tem a capacidade de ativá-los para um perfil pró-inflamatório durante os estágios iniciais das infecções (Martinez, 2008). Além disso, já foi demonstrado na literatura que o aumento da temperatura corporal se mostrou necessária para estimular a produção de NO e induzir a óxido nítrico sintase por macrófagos peritoneais, juntamente com a ação do LPS e IFN- $\gamma$ . Visto isso, investigamos quais seriam as possíveis complicações desse aumento de temperatura na somado a infecção por *Streptococcus pneumoniae*.

Hassan e colaboradores (2020) analisaram os efeitos da temperatura na atividade funcional de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS a 37 e 39°C, e observaram maiores níveis de NO nos grupos incubados a 39°C, quando comparados com os grupos a 37°C. Os mesmos resultados não foram encontrados por nosso grupo, uma vez que, na análise realizada com 6 horas de incubação, macrófagos estimulados com LPS não apresentaram diferenças significativas em ambas as temperaturas. Ao passo que, ao dosar os nitritos 24 horas depois, macrófagos estimulados apenas LPS se mantiveram os mesmos, enquanto os

macrófagos estimulados com LPS + *S.p.* apresentaram níveis mais elevados de NO na temperatura de 37°C, quando comparados com os grupos a 39°C, evidenciando uma maior responsividade inflamatória nesse cenário.

Em macrófagos, estudos demonstraram que o aumento da temperatura corporal para 39.5° C aumentou significativamente a capacidade de eliminação bacteriana, juntamente com os níveis de IL-1, IL-6 e TNF em camundongos tratados com LPS. Posteriormente, Lee e colaboradores demonstraram que a hipertermia induz a hiper-regulação de proteínas gênicas HSP70, sustentando a reprogramação de macrófagos para estarem altamente responsivos aos estímulos com LPS (Jiang *et al.*, 1999; Ostberg, Taylor e Baumann, 2000; Lee *et al.*, 2012; Evans, Repasky e Fisher, 2015). Kappel e colaboradores (1991) e Ensor e colaboradores (1994) realizaram experimentos bastante semelhantes para a dosagem de IL-6 e TNF. Ambos utilizaram macrófagos sanguíneos humanos com protocolos de hipertermia, embora Kappel e colaboradores não tenham previamente estimulado as células com LPS antes da incubação. Eles observaram que na temperatura de 39°C *in vitro*, havia um efeito supressor da produção de IL-6, mas não de TNF, ao passo que Ensor e colaboradores, que estimularam seus macrófagos com LPS, observaram que na temperatura de 40°C a expressão de IL-6 se manteve a mesma, enquanto a produção de TNF foi quase que totalmente inibida nessa mesma temperatura. Além disso, ainda observaram uma diminuição da concentração de mRNA do TNF, mas não da IL-6. Logo depois, Ensor e colaboradores (1995) realizaram um segundo teste utilizando macrófagos de linhagem RAW 264.7 estimulados com LPS e incubados a 37 e 40°C. Observaram um decaimento de 92% na produção de TNF a 40°C, quando comparados com a concentração de TNF produzida a 37°C. Ainda, analisaram a concentração de mRNA do TNF e observaram uma diminuição de 43% com relação a 37°C. A partir dos dois experimentos, concluíram que incubar macrófagos a temperaturas que simulem a febre leva a uma supressão da produção de TNF pela modulação do processo pós transcricional, levando a uma aceleração do processo de decaimento do mRNA dessa citocina.

Corroborando com esses resultados, Osteberg e colaboradores (2000) realizaram experimentos *in vitro* e *in vivo* com macrófagos peritoneais estimulados com LPS e colocados entre 39°C-40°C. O grupo observou, que nas análises *in vitro* sob altas temperaturas, houve uma diminuição na concentração das citocinas TNF e IL-6, quando comparadas com os experimentos *in vivo* sob as mesmas condições. Com isso, foi possível levantar a hipótese de

que os mecanismos e as moléculas envolvidas na febre são muito mais complexos do que apenas o aumento de temperatura. Com isso, também decidimos dosar as citocinas IL-10, IL-6 e TNF em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e infectados com a bactéria *S. pneumoniae* a 37 e 39°C durante 6 e 24 horas. Ao observar a IL-10, concluímos que ela não é afetada pelo aumento da temperatura em nenhuma das duas dosagens, não apresentando diferenças significativas entre os grupos em ambas as temperaturas. Diferente de resultados anteriores, nosso grupo observou um aumento significativo na produção de IL-6 a 37°C nos grupos estimulados com LPS e infectados com *S. pneumoniae*, ao passo que, nas duas dosagens, os grupos a 39°C apresentaram concentrações mínimas de IL-6, evidenciando um mecanismo de modulação negativa da temperatura na produção dessa citocina pró-inflamatória, independente dos estímulos recebidos. Paralelamente, corroborando com trabalhos anteriores, na dosagem de 6 horas, observamos uma diminuição bastante significativa de TNF na temperatura de 39°C, nos grupos LPS + *S.p.* e *S.p.*, evidenciando que os estímulos pró-inflamatórios foram eficientes na estimulação dos macrófagos, ao passo que a temperatura de 39°C representou um mecanismo inibitório para a produção dessa citocina.

Ainda encontramos alguma disparidade entre os resultados obtidos por diferentes grupos, que pode ser explicada por variações no protocolo de hipertermia desenvolvido por diferentes laboratórios. A grande maioria dos estudos que tem como objetivo avaliar os efeitos da elevação da temperatura na fase aguda das infecções, foram realizados *in vitro* com temperaturas variando entre 39°C e 42°C. Nesse sentido, os resultados *in vitro* mostram-se bastante consistentes ao descrever a hipertermia como um mecanismo inibitório da indução de TNF, e IL-6. Ao passo que Jiang e colaboradores (1999) observaram um contraste desses efeitos de elevação da temperatura *in vivo*, sugerindo que a febre pode regular positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias em organismos vivos. Assim, em consonância com os resultados obtidos pelo nosso grupo, é possível observar que a temperatura de 39°C aumenta o poder microbicida de macrófagos, ao mesmo tempo em que prejudica a liberação de nitritos, IL-6 e TNF. Acreditamos que esse aumento da capacidade microbicida pode ser explicado pelo possível aumento de outras citocinas pró-inflamatórias no meio, bem como pela ação da alta temperatura no metabolismo bacteriano, impedindo sua multiplicação.

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos nossos dados, é possível inferir que, *in vitro*, o aumento da temperatura (hipertermia) atua como um mecanismo modulador inibitório da atividade inflamatória, mas não microbicida de macrófagos pré-estimulados com LPS e infectados com a bactéria *Streptococcus pneumoniae*. Devido a importância ímpar que os macrófagos representam para o sistema imunológico, e a comprovação de que sofrem modulações distintas a partir de um mesmo estímulo (hipertermia) é importante levar em consideração a etapa em que a febre é neutralizada em diferentes contextos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (n.d.). *Imunologia Celular e Molecular 8ª EDIÇÃO*.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., & Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, *404*(6774), 193–197. <https://doi.org/10.1038/35004599>
- Atkins, E. (1960). Pathogenesis of Fever. *Physiological Reviews*, *40*(3), 580–646. <https://doi.org/10.1152/physrev.1960.40.3.580>
- Baker, F. C., Waner, J. I., Vieira, E. F., Taylor, S. R., Driver, H. S., & Mitchell, D. (2001). Sleep and 24-hour body temperatures: a comparison in young men, naturally cycling women and women taking hormonal contraceptives. *The Journal of Physiology*, *530*(3), 565–574. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0565k.x>
- Banet, M. (1986). Fever in mammals: is it beneficial? *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *59*(2), 117–124.
- Belon, L., Skidmore, P., Mehra, R., & Walter, E. (2021). Effect of a fever in viral infections — the ‘Goldilocks’ phenomenon? *World Journal of Clinical Cases*, *9*(2), 296–307. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i2.296>
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
- Blatteis, C. M. (2010). *Fever as a Host Defense Mechanism* (pp. 213–235). [https://doi.org/10.1016/S1567-7443\(10\)70023-5](https://doi.org/10.1016/S1567-7443(10)70023-5)
- Blatteis, C. M., Li, S., Li, Z., Feleder, C., & Perlik, V. (2005). Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *76*(1–4), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.01.001>
- Bleich, H. L., Boro, E. S., Dinarello, C. A., & Wolff, S. M. (1978). Pathogenesis of Fever in Man. *New England Journal of Medicine*, *298*(11), 607–612. <https://doi.org/10.1056/NEJM197803162981107>
- Bosurgi, L., Cao, Y. G., Cabeza-Cabrerizo, M., Tucci, A., Hughes, L. D., Kong, Y., Weinstein, J. S., Licon-Limon, P., Schmid, E. T., Pelorosso, F., Gagliani, N., Craft, J. E., Flavell, R. A., Ghosh, S., & Rothlin, C. v. (2017). Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*, *356*(6342), 1072–1076. <https://doi.org/10.1126/science.aai8132>
- Broom, M. (2007). Physiology of fever. *Paediatric Care*, *19*(6), 40–45. <https://doi.org/10.7748/paed2007.07.19.6.40.c4450>
- Broz, P., & Monack, D. M. (2013). Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nature Reviews Immunology*, *13*(8), 551–565. <https://doi.org/10.1038/nri3479>
- Cailhier, J. F., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Ko, K., Watson, S., Savill, J., Hughes, J., & Lang, R. A. (2005). Conditional Macrophage Ablation Demonstrates That Resident Macrophages Initiate Acute Peritoneal Inflammation. *The Journal of Immunology*, *174*(4), 2336–2342. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2336>
- Cannon, J. G. (2013). Perspective on fever: The basic science and conventional medicine. *Complementary Therapies in Medicine*, *21*, S54–S60. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2011.08.002>
- Cavallion, J.-M. (2021). Once upon a time, inflammation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0147>
- Conti, B. (2004). Cytokines and fever. *Frontiers in Bioscience*, *9*(1–3), 1433. <https://doi.org/10.2741/1341>
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*, *14*(10), 986–995. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>

- Dinareello, C. A. (1999). Cytokines as Endogenous Pyrogens. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(s2), S294–S304. <https://doi.org/10.1086/513856>
- Dinareello, C. A. (2004). Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *Journal of Endotoxin Research*, 10(4), 201–222. <https://doi.org/10.1179/096805104225006129>
- Djaldetti, M., & Bessler, H. (2015). High temperature affects the phagocytic activity of human peripheral blood mononuclear cells. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 75(6), 482–486. <https://doi.org/10.3109/00365513.2015.1052550>
- Edholm, E. S., Rhoo, K. H., & Robert, J. (2017). Evolutionary aspects of macrophages polarization. In *Results and Problems in Cell Differentiation* (Vol. 62, pp. 3–22). Springer Verlag. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_1)
- Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., & Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282–286. <https://doi.org/10.1038/nature08296>
- Elliott, M. R., Koster, K. M., & Murphy, P. S. (2017). Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*, 198(4), 1387–1394. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601520>
- Ensor, J. E., Wiener, S. M., McCrea, K. A., Viscardi, R. M., Crawford, E. K., & Hasday, J. D. (1994). Differential effects of hyperthermia on macrophage interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha expression. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 266(4), C967–C974. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.4.C967>
- Enzan, H. (1986). ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES OF MACROPHAGES IN EARLY HUMAN YOLK SACS. *Pathology International*, 36(1), 49–64. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1986.tb01460.x>
- Evans, S. S., Repasky, E. A., & Fisher, D. T. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), 335–349. <https://doi.org/10.1038/nri3843>
- Evans, S. S., Wang, W.-C., Bain, M. D., Burd, R., Ostberg, J. R., & Repasky, E. A. (2001). Fever-range hyperthermia dynamically regulates lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Blood*, 97(9), 2727–2733. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.9.2727>
- Fogg, D. K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D. R., Cumano, A., & Geissmann, F. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*, 311(5757), 83–87. <https://doi.org/10.1126/science.1117729>
- Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in Inflammation. In *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy* (Vol. 4).
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. v, Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., ... Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, 22(1), 58–73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Garami, A., Steiner, A. A., & Romanovsky, A. A. (2018). *Fever and hypothermia in systemic inflammation* (pp. 565–597). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00034-3>
- Garibaldi, J. A. (1972). Influence of Temperature on the Biosynthesis of Iron Transport Compounds by *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 110(1), 262–265. <https://doi.org/10.1128/jb.110.1.262-265.1972>

Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K. G., Gordonov, S., Mazloom, A. R., Ma'ayan, A., Chua, W.-J., Hansen, T. H., Turley, S. J., Merad, M., & Randolph, G. J. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, *13*(11), 1118–1128. <https://doi.org/10.1038/ni.2419>

Geneva, I. I., Cuzzo, B., Fazili, T., & Javaid, W. (2019). Normal Body Temperature: A Systematic Review. *Open Forum Infectious Diseases*, *6*(4). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz032>

Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*, *327*(5966), 656–661. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, *3*(1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>

Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, *5*(12), 953–964. <https://doi.org/10.1038/nri1733>

Han, C. Z., & Ravichandran, K. S. (2011). Metabolic Connections during Apoptotic Cell Engulfment. *Cell*, *147*(7), 1442–1445. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.006>

Harden, L. M., Kent, S., Pittman, Q. J., & Roth, J. (2015). Fever and sickness behavior: Friend or foe? *Brain, Behavior, and Immunity*, *50*, 322–333. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.012>

Hassan, I. A., Renfro, Z., Blake, H., Rath, S., & Durdik, J. M. (2020). Effect of temperature on functional activity of macrophages in three different species. *The Journal of Immunology*, *204*(1\_Supplement), 149.17-149.17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.204.Supp.149.17>

Hersh, D., Weiss, J., & Zychlinsky, A. (1998). How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Current Opinion in Microbiology*, *1*(1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80141-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80141-0)

Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2017). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 92. <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>

Hiruma, M., & Kagawa, S. (1986). Effects of hyperthermia on phagocytosis and intracellular killing of *Sporothrix schenckii* by polymorphonuclear leukocytes. *Mycopathologia*, *95*(2), 93–100. <https://doi.org/10.1007/BF00437167>

Ifrim, D. C., Quintin, J., Joosten, L. A. B., Jacobs, C., Jansen, T., Jacobs, L., Gow, N. A. R., Williams, D. L., van der Meer, J. W. M., & Netea, M. G. (2014). Trained Immunity or Tolerance: Opposing Functional Programs Induced in Human Monocytes after Engagement of Various Pattern Recognition Receptors. *Clinical and Vaccine Immunology*, *21*(4), 534–545. <https://doi.org/10.1128/CVI.00688-13>

Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>

Jiang, Q., Detolla, L., Singh, I. S., Gatdula, L., Fitzgerald, B., van Rooijen, N., Cross, A. S., & Hasday, J. D. (1999). Exposure to febrile temperature upregulates expression of pyrogenic cytokines in endotoxin-challenged mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *276*(6), R1653–R1660. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1653>

Johnston, B., & Butcher, E. C. (2002). Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Seminars in Immunology*, *14*(2), 83–92. <https://doi.org/10.1006/smim.2001.0345>

Kappel, M., Diamant, M., Hansen, M. B., Klokke, M., & Pedersen, B. K. (1991). Effects of in vitro hyperthermia on the proliferative response of blood mononuclear cell subsets, and detection of interleukins 1 and 6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology*, *73*(3), 304–308.

- Kawabata, A. (2011). Prostaglandin E2 and Pain-An Update. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(8), 1170–1173. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1170>
- Kawahara, K., Hohjoh, H., Inazumi, T., Tsuchiya, S., & Sugimoto, Y. (2015). Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.07.008>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*, 34(5), 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Kluger, M. J., Kozak, W., Conn, C. A., Leon, L. R., & Soszynski, D. (1996). THE ADAPTIVE VALUE OF FEVER. *Infectious Disease Clinics of North America*, 10(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70282-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70282-8)
- Kono, H., & Rock, K. L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 8(4), 279–289. <https://doi.org/10.1038/nri2215>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
- Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M., Xiao, Y., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., & Wesselborg, S. (2003). Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell*, 113(6), 717–730. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00422-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00422-7)
- Lech, M., Gröbmayer, R., Weidenbusch, M., & Anders, H.-J. (2012). Tissues Use Resident Dendritic Cells and Macrophages to Maintain Homeostasis and to Regain Homeostasis upon Tissue Injury: The Immunoregulatory Role of Changing Tissue Environments. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/951390>
- Lee, C.-T., Zhong, L., Mace, T. A., & Repasky, E. A. (2012). Elevation in Body Temperature to Fever Range Enhances and Prolongs Subsequent Responsiveness of Macrophages to Endotoxin Challenge. *PLoS ONE*, 7(1), e30077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030077>
- Liu, Y. C., Zou, X. B., Chai, Y. F., & Yao, Y. M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 10, Issue 5, pp. 520–529). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8879>
- LUHESHI, G. N. (1998). Cytokines and Fever: Mechanisms and Sites of Action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856(1), 83–89. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08316.x>
- Mackowiak, P. A. (1998). Concepts of Fever. *Archives of Internal Medicine*, 158(17), 1870. <https://doi.org/10.1001/archinte.158.17.1870>
- Mackowiak, P. A., Wasserman, S. S., & Levine, M. M. (n.d.). A critical appraisal of 98.6 degrees F, the upper limit of the normal body temperature, and other legacies of Carl Reinhold August Wunderlich. *JAMA*, 268(12), 1578–1580.
- MacMicking, J., Xie, Q., & Nathan, C. (1997). NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 323–350. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
- Martinez, F. O. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 453. <https://doi.org/10.2741/2692>
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 135–145. <https://doi.org/10.1038/35100529>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>

- Mickenberg, I. D., Snyderman, R., Root, R. K., Mergenhagen, S. E., & Wolff, S. M. (1971). The Relationship of Complement Consumption to Immune Fever. *The Journal of Immunology*, *107*(5), 1466–1476. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.107.5.1466>
- Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazzaro, D., Testa, U., Marinucci, M., & Peschle, C. (1986). Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac---liver transition. *Journal of Clinical Investigation*, *78*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1172/JCI112572>
- Mills, C. (2012). M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology*, *32*(6), 463–488. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, *164*(12), 6166–6173. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Mokarram, N., & Bellamkonda, R. v. (2014). A Perspective on Immunomodulation and Tissue Repair. *Annals of Biomedical Engineering*, *42*(2), 338–351. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0941-0>
- Mosser, D. M., Hamidzadeh, K., & Goncalves, R. (2021). Macrophages and the maintenance of homeostasis. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 579–587). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00541-3>
- Muller, W. A. (2003). Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology*, *24*(6), 326–333. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00117-0)
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, *11*(11), 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Nagata, S., Hanayama, R., & Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell*, *140*(5), 619–630. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.014>
- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, *420*(6917), 846–852. <https://doi.org/10.1038/nature01320>
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, *140*(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
- Netea, Kullberg, & van der Meer. (1999). Do only circulating pyrogenic cytokines act as mediators in the febrile response? A hypothesis. *European Journal of Clinical Investigation*, *29*(4), 351–356. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1999.00416.x>
- O’Grady, N. P., Barie, P. S., Bartlett, J. G., Bleck, T., Carroll, K., Kalil, A. C., Linden, P., Maki, D. G., Nierman, D., Pasculle, W., & Masur, H. (2008). Guidelines for evaluation of new fever in critically ill adult patients: 2008 update from the American College of Critical Care Medicine and the Infectious Diseases Society of America. *Critical Care Medicine*, *36*(4), 1330–1349. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318169eda9>
- Okabe, Y., & Medzhitov, R. (2016). Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology*, *17*(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/ni.3320>
- O’sullivan, D., Stanczak, M. A., Villa, M., Uhl, F. M., Corrado, M., Klein Geltink, R. I., Sanin, D. E., Apostolova, P., Rana, N., Edwards-Hicks, J., Grzes, K. M., Kabat, A. M., Kyle, R. L., Fabri, M., Curtis, J. D., Buck, M. D., Patterson, A. E., Regina, A., Field, C. S., ... Pearce, E. L. (n.d.). *Fever supports CD8 + effector T cell responses by promoting mitochondrial translation*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023752118/-/DCSupplemental>
- Ogoina, D. (2011). Fever, fever patterns and diseases called ‘fever’ – A review. *Journal of Infection and Public Health*, *4*(3), 108–124. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.05.002>
- Okin, D., & Medzhitov, R. (2012). Evolution of Inflammatory Diseases. *Current Biology*, *22*(17), R733–R740. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.029>

- Ostberg, J. R., Ertel, B. R., & Lanphere, J. A. (2005). An Important Role for Granulocytes in the Thermal Regulation of Colon Tumor Growth. *Immunological Investigations*, 34(3), 259–272. <https://doi.org/10.1081/IMM-200064477>
- Ostberg, J. R., Taylor, S. L., Baumann, H., & Repasky, E. A. (2000). Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(6), 815–820. <https://doi.org/10.1189/jlb.68.6.815>
- Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Mentink-Kane, M. M., Wilson, M. S., el Kasmi, K. C., Smith, A. M., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2009). Arginase-1–Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine–Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathogens*, 5(4), e1000371. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000371>
- Petri, B., & Bixel, M. G. (2006). Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS Journal*, 273(19), 4399–4407. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05439.x>
- Pieracci, F. M., & Barie, P. S. (2005). Iron and the Risk of Infection. *Surgical Infections*, 6(s1), s41–s46. <https://doi.org/10.1089/sur.2005.6.s1-41>
- Rather, L. J. (1971). Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 47(3), 303–322.
- Roberts, N. J., & Steigbigel, R. T. (1977). Hyperthermia and human leukocyte functions: effects on response of lymphocytes to mitogen and antigen and bactericidal capacity of monocytes and neutrophils. *Infection and Immunity*, 18(3), 673–679. <https://doi.org/10.1128/iai.18.3.673-679.1977>
- Ross, E. A., Devitt, A., & Johnson, J. R. (2021). Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186>
- Rubin, L. L. (1985). Increases in muscle Ca<sup>2+</sup> mediate changes in acetylcholinesterase and acetylcholine receptors caused by muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 7121–7125. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7121>
- Schenten, D., & Medzhitov, R. (2011). *The Control of Adaptive Immune Responses by the Innate Immune System* (pp. 87–124). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00003-0>
- Segawa, K., & Nagata, S. (2015). An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11(11), 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>
- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Letters*, 584(22), 4491–4499. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.046>
- Sneed, R. C. (1995). Hyperpyrexia associated with sustained muscle contractions: An alternative diagnosis to central fever. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 76(1), 101–103. [https://doi.org/10.1016/S0003-9993\(95\)80051-4](https://doi.org/10.1016/S0003-9993(95)80051-4)
- Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 10(6), 427–439. <https://doi.org/10.1038/nri2779>
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 76(2), 301–314. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90337-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90337-9)
- Stansfield, B. K., & Ingram, D. A. (2015). Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and Translational Medicine*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-014-0040-3>

- Tang, P., & Wang, J. M. (2018). Chemokines: the past, the present and the future. *Cellular & Molecular Immunology*, *15*(4), 295–298. <https://doi.org/10.1038/cmi.2018.9>
- Tavian, M., & Peault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *The International Journal of Developmental Biology*, *49*(2–3), 243–250. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041957mt>
- Thorne, S. H., Brooks, G., Lee, Y.-L., Au, T., Eng, L. F., & Reid, T. (2005). Effects of Febrile Temperature on Adenoviral Infection and Replication: Implications for Viral Therapy of Cancer. *Journal of Virology*, *79*(1), 581–591. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.581-591.2005>
- Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C., & Gregory, C. D. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, *112*(13), 5026–5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162404>
- van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *Journal of Experimental Medicine*, *128*(3), 415–435. <https://doi.org/10.1084/jem.128.3.415>
- Vasconcellos, L. S., Sabino, K. R., Petroianu, A., & Simal, C. J. R. (2003). Atividade fagocitária do sistema mononuclear fagocitário na gravidez. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, *25*(4). <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000400006>
- VESTWEBER, D., & BLANKS, J. E. (1999). Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands. *Physiological Reviews*, *79*(1), 181–213. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.181>
- Vestweber, D. (2002). Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Current Opinion in Cell Biology*, *14*(5), 587–593. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00372-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00372-1)
- Vestweber, D. (2003). Commentary Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins. *European Journal of Immunology*, *33*(5), 1361–1364. <https://doi.org/10.1002/eji.200324011>
- Walter, E. J., Hanna-Jumma, S., Carraretto, M., & Forni, L. (2016). The pathophysiological basis and consequences of fever. *Critical Care*, *20*(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1375-5>
- WEISS, G. (2005). Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, *18*(2), 183–201. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2004.09.001>
- Winger, R. C., Koblinski, J. E., Kanda, T., Ransohoff, R. M., & Muller, W. A. (2014). Rapid Remodeling of Tight Junctions during Paracellular Diapedesis in a Human Model of the Blood–Brain Barrier. *The Journal of Immunology*, *193*(5), 2427–2437. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400700>
- Wright, W. F., & Auwaerter, P. G. (2020). Fever and Fever of Unknown Origin: Review, Recent Advances, and Lingering Dogma. *Open Forum Infectious Diseases*, *7*(5). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa132>
- Wright, T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*, *2*(4), A171. <https://doi.org/10.2741/A171>
- Wrotek, S., Sobocińska, J., Kozłowski, H. M., Pawlikowska, M., Jędrzejewski, T., & Działuk, A. (2020). New Insights into the Role of Glutathione in the Mechanism of Fever. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), 1393. <https://doi.org/10.3390/ijms21041393>
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, *877*, 173090. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
- Zhang, C., Yang, M., & Ericsson, A. C. (2021). Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620510>