

O composto bioativo de *Baccharis dracunculifolia* recupera a inflamação induzida por LPS

Autores: Juliana Cogo Ferreira¹⁽¹⁾, Karina Furlani Zoccal¹⁽²⁾

Colaboradores: Vanessa Leiria Campo¹, Cristiane Tefé da Silva¹

¹Centro Universitário Barão de Mauá

⁽¹⁾julianacogo_@hotmail.com, ⁽²⁾karina.zoccal@baraodemaua.br

Resumo

Compostos bioativos derivados da própolis têm demonstrado efeitos terapêuticos promissores. Neste estudo, demonstramos o efeito anti-inflamatório da bacarina. Os animais inflamados e tratados com bacarina demonstraram redução de neutrófilos e mediadores inflamatórios. Assim, esses dados sugerem que a bacarina regula a migração celular, o que se correlaciona com resultados favoráveis em modelos de inflamação aguda.

Introdução

A inflamação é um processo complexo que opera em resposta a estímulos nocivos e danos aos tecidos (MEDZHITOV, 2008). A inflamação aguda é caracterizada pela infiltração tecidual e acúmulo de leucócitos, principalmente de neutrófilos e monócitos, aumento da permeabilidade vascular que promove extravasamento de proteínas e formação de edema (CHEN et al., 2007; ROCK et al., 2010). As alterações observadas ocorrem devido à produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-6, prostaglandinas) e anti-inflamatórios (por exemplo, IL-10, TGF- β , leucotrienos) (CHEN et al., 2007). No entanto, a inflamação excessiva ou desequilibrada pode levar a danos nos tecidos e tornar-se contraproducente.

As plantas medicinais e seus constituintes naturais têm sido utilizados em todo o mundo na medicina popular, para tratar processos inflamatórios de diversas origens. Particularmente no Brasil, espécies endêmicas de plantas ou seus extratos são amplamente utilizados pelas comunidades tradicionais, com o mesmo objetivo (de SOUZA et al., 2004; HOLETZ et al., 2002; de MELO et al., 2011).

A própolis tem uma composição química bastante complexa e variada. A própolis verde é denominada “verde” devido à sua origem botânica da espécie *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), planta nativa brasileira, amplamente distribuída em São Paulo e Minas Gerais (PARK

et al., 2004). Várias espécies de *Baccharis* vem sendo estudadas, e têm demonstrado atividades biológicas, tais como, antimicrobiana (SALOMÃO et al., 2004), anti-inflamatória (PAULINO et al., 2005), antioxidante (NAKANISHI et al., 2003) e antitumoral (AKAO et al., 2003). Mais especificamente, na medicina popular, a espécie *Baccharis dracunculifolia*, está sendo usada para o tratamento de doenças inflamatórias gastrointestinais (COSTA et al., 2019). Estudos demonstraram que os principais compostos da própolis verde são bacarina, artepilina C e ácido cumárico, e têm sido associados a efeitos antitumoral, especialmente contra linhagens celulares de câncer de mama e de próstata (ENDO et al. 2014; PENNING 2017; RODRIGUES et al., 2019).

Apesar do crescimento da investigação com produtos naturais para efeitos de tratamento de inúmeras doenças (MARCUCCI et al., 2001), até o momento, nada se sabe sobre a participação do composto bacarina, isolado da própolis verde (*Baccharis dracunculifolia*) frente a inflamação aguda.

Objetivos

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito anti-inflamatório da bacarina, isolada da própolis verde, *Baccharis dracunculifolia*, na cavidade estéril, utilizando-se o modelo *air pouch*, em camundongos.

Objetivos específicos

- ✓ Verificar a migração leucocitária após a administração da bacarina em cavidade inflamada, no fluido da bolha;
- ✓ Avaliar a indução do edema através da quantificação de proteínas totais;
- ✓ Quantificar a produção de mediadores inflamatórios (IL-6, IL-1 β , TNF- α);
- ✓ Analisar e quantificar as células do tecido subcutâneo.

Materiais e Métodos

Animais: Camundongos da linhagem Balb/c, pesando aproximadamente 20 g, foram mantidos no biotério do Centro Universitário Barão de Mauá, em ambiente com umidade, onde receberam dieta padrão e água *livre*. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação animal (CEPAN), do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto sob protocolo de número 346/19.

Isolamento e preparo do composto bacarina:

Um quilograma de própolis verde, fornecidas pela empresa Apis Flora Ltda foram congeladas, pulverizadas em moinho de facas e submetidas à maceração em solução hidroalcoólica 7:3, seguida de percolação, a cada três dias, por três vezes consecutivas. A solução hidroalcoólica obtida foi devidamente filtrada e evaporada em rotaevaporador e, em seguida, liofilizada com a finalidade de se obter o extrato hidroalcoólico bruto. O extrato obtido foi posteriormente submetido tanto à cromatografia líquida a vácuo (CLV), quanto à cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC – *High Speed counter current Chromatography*). As frações obtidas foram reunidas e purificadas em sistema preparativo CLAE-UV (Shimadzu), utilizando coluna preparativa C8 (Shimadzu Shim-pack prep.-ODS) e sistema de eluição por gradiente MeOH/água, fornecendo cerca de 0,5 g de bacarina pura. O composto bacarina foi cedido pela Profa Dra Vanessa Leiria Campo, em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP. O composto foi suspenso em 997 µL de PBS 1x (tampão de fosfato salino) e 3 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) - final concentração 1mg/mL).

Indução de *air pouch* e injeção de estímulos na cavidade:

Este modelo consiste da formação de uma cavidade artificial no dorso dos animais a partir da injeção subcutânea de ar estéril. Inicialmente, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com xilazina (15 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg). Depois foi injetado 3 mL de ar estéril no dorso dos animais via subcutânea com uma agulha de 25 G através de um filtro estéril (Millex GV 0.22 µm—Merck Millipore Ltd, Tullagreen, IRL). O dia da injeção foi considerado como o primeiro dia. Três dias após, foram injetados mais 2 mL de ar estéril. No sexto dia após a primeira inoculação de ar, os animais receberam 500 µL de PBS ou lipopolissacarídeo (LPS) dentro do *airpouch* (FRONZA et al., 2016). E após 1 hora, um grupo de animais foi tratado ou

não com a bacarina (500 µg/kg). Controles receberam apenas PBS estéril. Grupo controle (sem estímulo inflamatório): recebeu 1 mL de PBS e 1 hora depois mais 1 mL de PBS; Grupo LPS: recebeu 1 mL de LPS na concentração de 1 µg/mL e 1 hora depois, recebeu 1 mL de PBS; Grupo LPS+bacarina: recebeu 1 mL de LPS na concentração de 1 µg/mL e 1 h depois, 1 mL de solução contendo bacarina na concentração de 500 µg/kg. Após 4 h da última injeção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as bolsas lavadas com 2 mL de PBS estéril. Com auxílio de uma pipeta ou ponteira de 1000 µL, os lavados foram coletados e utilizados para contagem total e diferencial de células. Após centrifugação dos lavados, os fluidos foram guardados a -20°C para posterior quantificação de proteínas e citocinas. As bolhas foram coletadas para análise histopatológica da pele subcutânea. Os experimentos foram realizados duas vezes.

Avaliação do acúmulo de leucócitos dentro da cavidade da bolha (*air pouch*):

Após a eutanásia dos animais, 2 mL de PBS estéril foram injetados dentro da bolha, a qual foi massageada gentilmente por 1 minuto. O Lavado da Cavidade (LC) foi coletado individualmente e conservado em gelo. Para contagem do número total de células presentes no LC, foram retiradas 20 µL de cada amostra, as quais foram diluídas em 380 µL de solução de Turk. A contagem diferencial das células foi feita em esfregaços, preparados em citocentrífuga e corados pelo corante Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). Foram contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x, em microscópio óptico.

Quantificação de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA):

Os sobrenadantes da cavidade de ar foram empregados para avaliação de produção das citocinas IL-1β e IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, EUA). As concentrações foram determinadas empregando anticorpos de captura, citocinas/quimiocinas-padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com estrepto-avidina-peroxidase. Como substrato foi utilizado tetrametilbenzidina (TMB) e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico 1M (H₂SO₄) aos poços. A leitura das amostras foi feita em filtro de 450 nm. As concentrações de citocinas foram determinadas utilizando uma curva padrão criada com a citocina recombinante adequada (expressos em pg/mL).

Quantificação de proteínas: O extravasamento de proteínas foi avaliado no sobrenadante livre de células pelo método de Bradford, empregando “kit” comercial (Pierce, Rockford, USA), conforme especificações do fabricante.

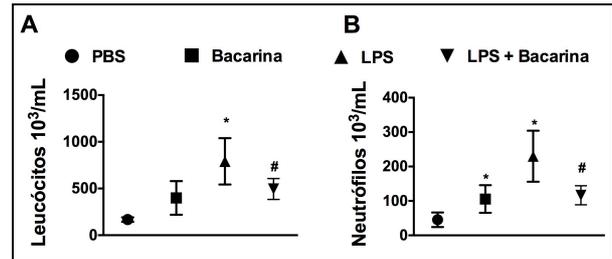
Histopatologia: A análise morfométrica das bolhas foram realizadas utilizando o programa LeicaQwin (Leicamaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), videocâmara (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heeburg, Suíça) e um computador on-line. Foram utilizados os cortes corados com HE, para verificação e quantificação do número de células.

Análises estatísticas: Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados por teste ANOVA seguido do pós-teste de comparações Múltiplas de Newman-Keuls. Para comparação entre duas amostras não pareadas, será utilizado o test t-Student. A significância estatística será considerada para valores de $p < 0.05$.

Resultados

Embora diferentes compostos isolados da própolis verde exibam propriedades anti-inflamatórias, os mecanismos responsáveis por esses efeitos são desconhecidos. Para investigar se a infiltração de leucócitos nos focos inflamatórios é afetada, usamos o modelo de bolsa de ar da inflamação induzida por LPS. Primeiro, observamos que o composto bacarina, *per se*, ou seja, sem estímulo inflamatório, induz recrutamento para a cavidade estéril, quando comparado ao controle PBS (Fig. 1B). Entretanto, nas bolsas inflamadas, demonstramos que a bacarina diminuiu o recrutamento de leucócitos (Fig. 1A), principalmente de neutrófilos (Fig. 1B), quando comparado aos animais que receberam apenas o estímulo inflamatório (LPS).

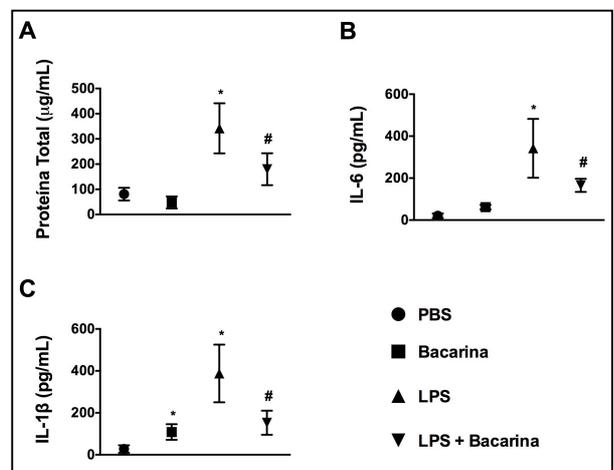
Figura 1. Bacarina diminui leucócitos em bolsa de ar inflamada. Bolsas de ar foram inoculadas com solução de salina tamponada (PBS, 1 mL/bolsa) ou com LPS (1 μ g/mL), e após 1h, os animais receberam ou não na bolha, a injeção com bacarina (500 μ g/kg, com volume de 1mL/bolha). Após 4 horas, (A) Leucócitos e (B) neutrófilos foram contados no lavado da bolsa de ar após coloração, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são apresentados como média \pm SEM ($n=5$), $comp < 0.05$ de acordo com ANOVA.*PBS ou LPS *versus* bacarina; #LPS *versus* LPS+Bacarina.



Fonte: Autoria própria.

Altas quantidades de proteínas totais acumuladas nos sítios inflamatórios é conhecida como consequência do aumento da permeabilidade vascular, refletindo a formação de edema. Como esperado, o estímulo LPS induziu aumento significativo nos níveis de proteína total, enquanto que a bacarina suprimiu a formação de edema comparado ao estímulo inflamatório (Fig. 2A). É importante ressaltar que a bacarina também diminuiu a produção de IL-6 (Fig. 2B) e IL-1 β (Fig. 2C) nos animais do grupo LPS+bacarina comparados ao grupo dos animais inflamados. Essas citocinas desempenham papéis importantes nos diferentes processos, como recrutamento de neutrófilos (Fig. 1B) e formação de edema (Fig. 2A).

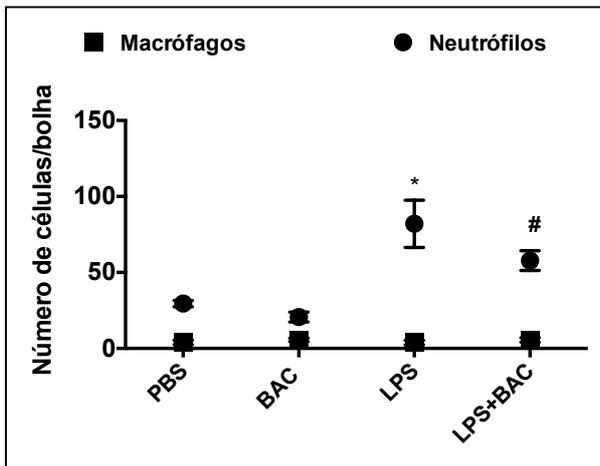
Figura 2. Bacarina diminui a produção de proteína total, IL-1 β e IL-6 no sítio inflamatório. Bolsas de ar foram inoculadas com PBS (1 mL/bolsa) ou com LPS (1 μ g/mL com volume de 1mL/bolha) e, após 1 hora, foi inoculado na bolsa PBS ou bacarina (500 μ g/kg com volume de 1mL/bolha), conforme descrito em Material e Métodos. Após 4 horas da última inoculação, o lavado da bolha foi coletado e centrifugado para dosagem de (A) proteína total pelo método de Bradford; e dosagem de citocinas, (B) IL-1 β e (C) IL-6 pelo método de ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm SEM ($n = 5$). Análise estatística significativa para $p < 0.05$, utilizando o teste one-way ANOVA.*PBS *versus* LPS; #LPS *versus* LPS+bacarina.



Fonte: Autoria própria.

Por fim, nós demonstramos o número de células presentes no tecido subcutâneo (na bolha) após a injeção do composto bacarina, em animais inflamados ou não, conforme metodologia apresentada acima. Podemos observar na figura 3 que o número de neutrófilos presentes na bolha diminui no grupo de animais inflamados que receberam bacarina, quando comparado ao grupo LPS. Entretanto, o número de macrófagos não demonstrou alteração em nenhum grupo estudado. Em conjunto, esses resultados demonstraram que o composto bacarina diminuiu a inflamação induzida pelo LPS.

Figura 3. Análise morfométrica das bolhas. O número de células (neutrófilos e macrófagos) na bolha foram contados após coloração com HE, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados são apresentados como média \pm SEM ($n=5$), $comp < 0.05$ de acordo com ANOVA. *PBS ou LPS *versus* bacarina; #LPS *versus* LPS+Bacarina.



Fonte: Autoria própria.

Discussão

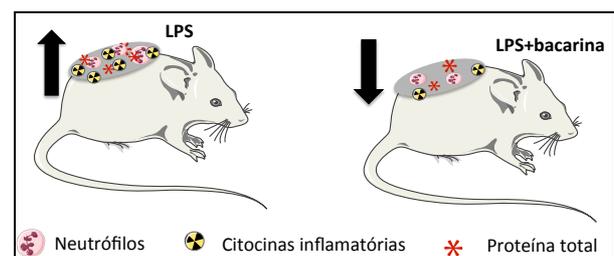
A busca de novos compostos com atividade anti-inflamatória com efeitos colaterais mínimos é um desafio. Muitas fontes naturais inexploradas com atividade biológica significativa estimulam a pesquisa para preencher essa lacuna. Neste estudo, confirmamos que bacarina exibe propriedades anti-inflamatórias no modelo de *air pouch*. No entanto, estudos futuros são necessários para identificar compostos específicos e as atividades biológicas associadas, para entender seus mecanismos de ação. O impacto significativo da injeção de bacarina após o desafio com LPS, um modelo agudo de inflamação, indica um efeito rápido capaz de regular o recrutamento de neutrófilos, a produção de citocinas e a formação de edema. Esses processos são críticos para o controle e eliminação de patógenos, mas respostas desreguladas podem causar danos aos tecidos e agravar a doença (KOLACZKOWSKA and

KUBES, 2013; WRIGHT et al., 2010). IL-6 e IL-1 β são citocinas pleiotrópicas que regulam uma ampla gama de eventos biológicos, incluindo diferenciação celular, proliferação, desenvolvimento de tecidos e apoptose, além de respostas imunes inatas e adaptativas (QU et al., 2018; ZHANG et al. 2008). Além disso, essas citocinas contribuem para o acúmulo excessivo de neutrófilos no tecido durante a inflamação. Durante a artrite reumatoide, os neutrófilos acumulam e destroem o tecido sinovial em resposta ao TNF- α e IL-6 (HWANG et al., 2004; TUDAN et al., 2000, VERRI et al., 2010). Recentemente, foi demonstrado que a IL-1 β é necessária para o acúmulo de neutrófilos nos pulmões, formação de edema e morte (ZOCCAL et al., 2016). Nosso grupo demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *Arctium lappa* suprime a inflamação causada por estímulo inflamatório, com diminuição na produção de citocinas, proteína total (NASCIMENTO et al., 2019). Os dados aqui relatados também apoiam outros achados que mostram o efeito benéfico dos compostos bioativos isolados da própolis, *B. dracunculifolia*, durante diversas doenças inflamatórias (ENDO et al. 2014; PENNING 2017; RODRIGUES et al., 2019; SALOMÃO et al., 2004; PAULINO et al., 2005; NAKANISHI et al., 2003; AKAO et al., 2003; COSTA et al., 2019).

Conclusão

Dado que a inflamação provoca alterações locais nos vasos sanguíneos e no recrutamento celular, causando os sinais característicos da doença, a busca por compostos terapêuticos é de extrema importância. Nossos resultados sugerem que o composto bacarina, isolado da própolis verde, tem atividade anti-inflamatória (Fig. 4), podendo ser considerado um agente promissor na terapêutica de doenças inflamatórias agudas.

Figura 4. Figura esquemática dos resultados no modelo de *air pouch*. Bacarina reduz a inflamação induzida pelo LPS, dado que observamos diminuição na produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-1), proteína total e recrutamento de neutrófilos quando comparado ao grupo inflamado.



Fonte: Autoria própria.

Referências

- AKAO, Y., MARUYAMA, H., MATSUMOTO, K., OHGUCHI, K., NISHIZAWA, K., SAKAMOTO, T., ARAKI, Y., MISHIMA, S., NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biol. Pharm. Bull.** v.26, p. 1057–1059, 2003.
- CHEN, C.J.; KONO, H.; GOLENBOCK, D.; REED, G.; AKIRA, S.; ROCK, K.L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. **Nat. Med.** v. 13, p. 851–856, 2007.
- COSTA, P.; BOEING, T.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; ESPÍNDOLA, V.L.; FRANÇA, T.C.S.; DE ALMEIDA, M.O.; ARRUDA, C.; BASTOS, J.K.; DA SILVA, L.M.; DE ANDRADE, S.F. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **Biofactors.**, v. 45(3), p. 479-489, 2019.
- DE MELO, J.G.; SANTOS, A.G.; DE AMORIM, E.L.; DO NASCIMENTO, S.C.; DE ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** 365359, 2011.
- DE SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J. Ethnopharmacol.** v. 90, p. 135–143, 2004.
- ENDO, S.; HU, D.; MATSUNAGA, T.; OTSUJI, Y.; EL-KABBANI, O.; KANDEEL, M.; IKARI, A.; HARA, A.; KITADE, Y.; TOYOOKA, N. Synthesis of non-prenyl analogues of baccharin as selective and potent inhibitors for aldo-ketoreductase 1C3. **Bioorg Med Chem**, v. 22, p. 5220–5233, 2014.
- FRONZA, M.; MUHR, C.; DA SILVEIRA, DS; SORGI, CA; RODRIGUES, SF; FARSKY, SH; PAULA-SILVA, FW; MERFORT, I; FACCIOLI, LH. Hyaluronidase decreases neutrophils infiltration to the inflammatory site. **Inflamm Res.** v. 65(7), pp. 533-542, 2016.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias Inst. Oswaldo Cruz.** v.97, p. 1027–1031, 2002.
- HWANG, S.Y.; KIM, J.Y.; KIM, K.W.; PARK, M.K.; MOON, Y.; KIM, W.U.; KIM, H.Y. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. **Arthritis Res. Ther.**, v.6, p. 120–128, 2004.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 159–175, 2013.
- MARCUCCI, M.C., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., BANKOVA, V.S., DE CASTRO, S.L., DANTAS, A.P., PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.** v.74, p. 105–112, 2001.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature.** v. 454(7203), p. 428-35, 2008.
- NAKANISHI, I., UTO, Y., OHKUBO, K., MIYAZAKI, K., YAKUMARU, H., URANO, S., OKUDA, H., UEDA, J., OZAWA, T., FUKUHARA, K., FUKUZUMI, S., NAGASAWA, H., HORI, H., IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Org. Biomol. Chem.** v.1, p. 1452–1454, 2003.
- NASCIMENTO, B.A.C., GARDINASSI, L.G., SILVEIRA, I.M.G., GALLUCCI, M.G., TOMÉ, M.A., OLIVEIRA, J.F.D., MOREIRA, M.R.A., MEIRELLES, A.F.G., FACCIOLI, L.H., TEFÉ-SILVA, C., ZOCCAL, K.F. *Arctium lappa* Extract Suppresses Inflammation and Inhibits Melanoma Progression. **Medicines (Basel).** v. 29,6(3), 2019.
- PARK, Y.K., PAREDES-GUZMAN, J.F., AGUIAR, C.L., ALENCAR, S.M., FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem.** v.52, p. 1100–1103, 2004.
- PAULINO, N. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato padronizado de própolis p1 e de seu principal constituinte ativo, artemillin C. **Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 137 p., 2005.
- PENNING, T.M. Aldo-KetoReductase (AKR) 1C3 inhibitors: a patent review. **Expert Opin Ther Pat.** v. 27, p. 1329–1340, 2017.
- ROCK, K.L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The sterile inflammatory response. **Annu. Rev. Immunol.** v. 28, p. 321–342, 2010.
- RODRIGUES, D.M.; DE SOUZA, M.C.; ARRUDA, C.; PEREIRA, R.A.S.; BASTOS, J.K. The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **J Chem Ecol.** 2019.
- SALOMÃO, K., DANTAS, A.P., BORBA, C.M., CAMPOS, L.C., MACHADO, D.G., AQUINO NETO, F.R., DE CASTRO, S.L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Lett. Applied Microbiol.** v. 38, p. 87–92, 2004.
- QU, X.; TANG, Y.; HUA, S. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. **Front. Immunol.** v. 9, p. 563, 2018.
- TUDAN, C.; JACKSON, J.K.; BLANIS, L.; PELECH, S.L.; BURT, H.M. Inhibition of TNF-

alpha-induced neutrophil apoptosis by crystals of calcium pyrophosphate dihydrate is mediated by the extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways upstream of caspase 3. **J. Immunol.**v. 165, p. 5798–5806, 2000.

VERRI, W.A., JR.; SOUTO, F.O.; VIEIRA, S.M.; ALMEIDA, S.C.; FUKADA, S.Y.; XU, D.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, T.M.; GUERRERO, A.T.; MATTOS-GUIMARAES, R.B.; et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. **Ann. Rheum. Dis.**v. 69, p. 1697–1703, 2010.

WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.J.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases.

Rheumatology, v.49, p. 1618–1631, 2010.

ZHANG, H.; YAN, D.; SHI, X.; LIANG, H.; PANG, Y.; QIN, N.; CHEN, H.; WANG, J.; YIN, B.; JIANG, X.; FENG, W.; et al. Transmembrane TNF-alpha mediates “forward” and “reverse” signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells. **J.**

Leukoc. Biol.v. 84, p. 789–797, 2008.

ZOCCAL, K.F.; SORGI, C.A.; HORI, J.I.; PAULA-SILVA, F.W.; ARANTES, E.C.; SEREZANI, C.H.; ZAMBONI, D.S.; FACCIOLI, L.H. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nat. Commun.**v. 7, p. 10760,2016.