

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

THIAGO CAETANO ANDRADE BELO

**O PAPEL DA IVERMECTINA NA RESPOSTA IMUNE INATA EM
QUADROS AGUDOS DE PNEUMONIA CAUSADA POR
*Pseudomonas aeruginosa***

Alfenas/MG

2026

THIAGO CAETANO ANDRADE BELO

**O PAPEL DA IVERMECTINA NA RESPOSTA IMUNE INATA EM
QUADROS AGUDOS DE PNEUMONIA CAUSADA POR
*Pseudomonas aeruginosa***

Trabalho de Tese apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Alfenas/MG

2026

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Belo, Thiago Caetano Andrade Belo.

O papel da ivermectina na resposta imune inata em quadros agudos de pneumonia causada por *Pseudomonas aeruginosa* / Thiago Caetano Andrade Belo. - Alfenas, MG, 2026.

105 f. : il. -

Orientador(a): Leonardo Augusto de Almeida.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Ivermectina. 2. Macrófago. 3. TLR4. 4. MD-2. 5. *Pseudomonas aeruginosa*. I. de Almeida, Leonardo Augusto, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

THIAGO CAETANO ANDRADE BELO

O PAPEL DA IVERMECTINA NA RESPOSTA IMUNE INATA EM QUADROS AGUDOS DE PNEUMONIA CAUSADA POR
Pseudomonas aeruginosa

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2026.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Carlos Roberto Prudêncio
Instituição: Instituto Adolfo Lutz

Prof. Dr. Fábio Antônio Vitarelli Marinho
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais
UFMG

Profa. Dra. Deyse Cristina Madruga Carvalho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Profa. Luciana Azevedo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Augusto de Almeida, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2026, às 20:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1734028** e o código CRC **BC72F96B**.

Dedico este trabalho ao Thiago do 1º período da faculdade, para quem o título de doutor enchia seus olhos e o fazia sonhar.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — Brasil (CAPES) — Código de Financiamento 001 e à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

“Uma coisa que aprendi ao longo de uma longa vida: que toda a nossa ciência, medida em relação à realidade, é primitiva e infantil — e, ainda assim, é a coisa mais preciosa que temos.”

(Albert Einstein)

RESUMO

O receptor do tipo Toll 4 (TLR4) é um receptor de reconhecimento de padrões (PRR) amplamente distribuído nos macrófagos, responsável por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O complexo MD2 se integra ao TLR4, sendo ambos necessários para o reconhecimento dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa de bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos demonstraram que o tratamento com ivermectina melhora a sobrevivência de camundongos após a administração de uma dose letal de LPS, embora os mecanismos de ação envolvidos nesse processo ainda não estejam elucidados. Desta forma, foram realizadas análises *in silico* utilizando ancoragem molecular, e foi constatado que a ivermectina se liga ao MD2 do complexo TLR4/MD2. Para avaliar se essa interação afeta a imunofuncionalidade de macrófagos, estes foram derivados de células da medula óssea murina, tratados com ivermectina e infectados com *P. aeruginosa* PA14. A ivermectina não afetou a viabilidade celular, prejudicou a depuração bacteriana, reduziu a secreção de NO e TNF- α , além de aumentar a ativação de NF- κ B em macrófagos RAW 264.7 desafiados com LPS, sendo esses efeitos revertidos após a inibição do MD2. Camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} foram tratados com ivermectina ou PBS e subsequentemente infectados intratraquealmente com PA14. O tratamento com ivermectina reduziu a carga bacteriana pulmonar em camundongos TLR4^{-/-}, diminuiu o infiltrado inflamatório e os níveis de IL-6 e TNF- α , ao mesmo tempo em que aumentou os níveis de IL-17A e IFN- γ nos pulmões dos camundongos infectados, com efeitos mais pronunciados em camundongos TLR4^{-/-}. Em conjunto, esses achados sugerem que a ivermectina ao se ligar ao MD2, suprimiu a atividade microbicida dos macrófagos *in vitro*. No entanto, *in vivo*, particularmente em camundongos TLR4^{-/-}, o tratamento com ivermectina melhorou a depuração bacteriana, parâmetros histopatológicos pulmonares e a secreção diferencial de citocinas, destacando uma possível ação imunomodulatória da ivermectina.

Palavras-chave: ivermectina; macrófago; TLR4; MD-2; *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Toll-like receptor 4 (TLR4) is a pattern recognition receptor (PRR) widely distributed in macrophages and responsible for recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The MD-2 complex associates with TLR4, and both are required for the recognition of lipopolysaccharides (LPS) present in the outer membrane of Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*. Studies have shown that treatment with ivermectin improves mouse survival following administration of a lethal dose of LPS, although the mechanisms involved in this process remain unclear. Thus, in silico analyses using molecular docking were performed, revealing that ivermectin binds to MD-2 within the TLR4/MD-2 complex. To evaluate whether this interaction affects macrophage immunofunctionality, macrophages derived from murine bone marrow cells were treated with ivermectin and infected with *P. aeruginosa* PA14. Ivermectin did not affect cell viability, impaired bacterial clearance, reduced NO and TNF- α secretion, and increased NF- κ B activation in LPS-challenged RAW 264.7 macrophages; these effects were reversed following MD-2 inhibition. C57BL/6 and TLR4^{-/-} mice were treated with ivermectin or PBS and subsequently infected intratracheally with PA14. Ivermectin treatment reduced pulmonary bacterial burden in TLR4^{-/-} mice, decreased inflammatory infiltrate and IL-6 and TNF- α levels, while increasing IL-17A and IFN- γ levels in the lungs of infected mice, with more pronounced effects in TLR4^{-/-} animals. Taken together, these findings suggest that ivermectin, by binding to MD-2, suppressed macrophage microbicidal activity in vitro. However, *in vivo*, particularly in TLR4^{-/-} mice, ivermectin treatment improved bacterial clearance, pulmonary histopathological parameters, and differential cytokine secretion, highlighting a possible immunomodulatory action of ivermectin.

Keywords: ivermectin; macrophages; TLR4; MD-2; *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Interação entre fatores de virulência da <i>P. aeruginosa</i> e a resposta imunoinflamatória pulmonar..... | 26 |
| Figura 2 – Hipótese mecanística da ação imunomoduladora da ivermectina via complexo TLR4/MD-2 em macrófagos e suas possíveis repercussões na infecção pulmonar por <i>P. aeruginosa</i> | 36 |
| Figura 3 - Fluxograma metodológico do acoplamento molecular <i>in silico</i> envolvendo receptores TLRs, em especial do complexo TLR4/MD-2 e ivermectina..... | 39 |
| Figura 4 - Desenho experimental <i>in vitro</i> para avaliação da inibição do complexo TLR4/MD-2, tratamento com ivermectina e infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em macrófagos murinos..... | 44 |
| Figura 5 - Desenho experimental <i>in vivo</i> para avaliação do papel do complexo TLR4/MD-2 no tratamento com ivermectina durante a infecção pulmonar por <i>P. aeruginosa</i> PA14..... | 46 |
| Figura 6 - Representação estrutural das interações entre a ivermectina e o complexo TLR4/MD-2 obtidas por <i>docking</i> molecular..... | 55 |
| Figura 7 - Avaliação da viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com ivermectina..... | 58 |
| Figura 8 – Efeito da ivermectina sobre a ativação da via do NF- κ B e a secreção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7..... | 59 |
| Figura 9 – Viabilidade de BMDM tratados e infectados com PA14..... | 60 |
| Figura 10 – Consumo de glicose e secreção de lactato por BMDM tratados com ivermectina e infectados com PA14..... | 62 |
| Figura 11 – A ivermectina prejudica a eliminação de PA14 por macrófagos tratados, sendo este efeito revertido pela inibição de TLR4/MD-2..... | 63 |
| Figura 12 – A secreção de TNF- α por BMDM é prejudicada com o tratamento de ivermectina, sendo este efeito parcialmente revertido pela inibição de TLR4/MD-2..... | 64 |
| Figura 13 - A ivermectina prejudica a secreção de NO por macrófagos infectados com PA14, sendo este efeito revertido pela inibição de TLR4/MD-2..... | 66 |
| Figura 14 - O tratamento com ivermectina não alterou a ingestão de ração, nem o peso corporal dos camundongos..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 – O tratamento com ivermectina reduziu a recuperação de bactérias viáveis nos pulmões de camundongos infectados TLR4 ^{-/-} | 70 |
| Figura 16 - O tratamento com ivermectina melhorou os parâmetros histopatológicos pulmonares em camundongos C57BL/6 e TLR4 ^{-/-} infectados com PA14..... | 72 |
| Figura 17 - O tratamento com ivermectina melhorou os parâmetros esterológicos pulmonares em camundongos C57BL/6 e TLR4 ^{-/-} infectados com PA14..... | 74 |
| Figura 18 - O tratamento com ivermectina reduziu a secreção de IL-6 e TNF- α no pulmão de camundongos C57BL/6 e TLR4 ^{-/-} infectados com PA14..... | 76 |
| Figura 19 - O tratamento com ivermectina aumentou a produção pulmonar de IL-17A e IFN- γ e promoveu a maior funcionalidade de subpopulações Th17 e Th1 em camundongos infectados com PA14..... | 79 |
| Figura 20 - Representação esquemática dos efeitos da ivermectina sobre a resposta imune inata e adaptativa de camundongos durante infecção por <i>P. aeruginosa</i> | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Identificação dos compostos controle utilizados nas análises de <i>docking</i> molecular para cada receptor TLR e para o correceptor MD-2..... | 52 |
| Tabela 2 - Energias de ligação (kcal/mol) obtidas por <i>docking</i> molecular entre a ivermectina, compostos controle e os receptores Toll-like (TLR1–TLR9) e o correceptor MD-2..... | 53 |
| Tabela 3 - Resultados das análises de <i>docking</i> molecular entre a ivermectina, compostos controle e proteínas intracelulares da via canônica de sinalização do NF- κ B..... | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ACK – tampão de lise de hemácias

ADN – ácido desoxirribonucleico

ANOVA – análise de variância

AprA – protease alcalina A

ATP – adenosina trifosfato

B7 – moléculas coestimuladoras CD80/CD86

BMDM – *Bone marrow-derived macrophages*

BSA – albumina sérica bovina

CD – *cluster* de diferenciação

CD14 – receptor de lipopolissacarídeo associado ao TLR4

CD4 – linfócitos T auxiliares CD4⁺

CD8 – linfócitos T citotóxicos CD8⁺

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

COX-2 – ciclo-oxigenase 2

c-di-GMP – guanosina monofosfato cíclico di

DGC – diguanilato ciclase

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica

eDNA – DNA extracelular

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK – extracellular signal-regulated kinase

EPS – exopolissacarídeos extracelulares

Fc – *fragment crystallizable*

FDA – *Food and Drug Administration*

FC – fibrose cística

GABA – ácido gama-aminobutírico

GPELF – *Global ProGramme to Eliminate Lymphatic Filariasis*

H&E – hematoxilina e eosina

IC₅₀ – concentração inibitória de 50%

IFN- γ – interferon gama

IKK – complexo quinase do I κ B

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

IL-10 – interleucina 10

IL-17 – interleucina 17

IL-17A – interleucina 17A

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IRAK – interleukin-1 receptor–associated kinase

JNK – c-Jun N-terminal kinase

LB – Luria–Bertani

LCCM – *L929 cell conditioned medium*

LPS – lipopolissacarídeo

MAPK – *mitogen-activated protein kinase*

M-CSF – *macrophage colony-stimulating factor*

MD-2 – *myeloid differentiation factor 2*

MHC – *major histocompatibility complex*

MOI – *multiplicity of infection*

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MyD88 – *myeloid differentiation primary response protein 88*

NETs – *neutrophil extracellular traps*

NF- κ B – fator nuclear kappa B

NLRC4 – *NLR family CARD domain-containing protein 4*

NLRP3 – *NLR family pyrin domain-containing protein 3*

NO – óxido nítrico

OCP – *Onchocerciasis Control Programme*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA14 – cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*

PAMP – *Pathogen-associated molecular pattern*

PBS – *phosphate-buffered saline*

PDB – *Protein Data Bank*

PDE – fosfodiesterase

PGE₂ – prostaglandina E₂

PRR – *pattern recognition receptor*

RAW 264.7 – linhagem murina de macrófagos RAW 264.7

RHL – sistema regulatório Rhl

RNA – ácido ribonucleico

RORγT – receptor related orphan receptor gamma t

RMSD – *root mean square deviation*

SARS-CoV-2 – *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SFB – soro fetal bovino

STAT – *signal transducer and activator of transcription*

TAK1 – TGF-β-activated kinase 1

Th1 – linfócitos T auxiliares do tipo 1

Th17 – linfócitos T auxiliares do tipo 17

TLR – *Toll-like receptor*

TNF-α – fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 – *TNF receptor-associated factor 6*

UFC – unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.0 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 1.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA | 19 |
| 1.1.2 IVERMECTINA: DE UM ANTIPARASITÁRIO À IMUNOMODULAÇÃO E APLICAÇÃO EM OUTROS CONTEXTOS PATOLÓGICOS | 28 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA: | 35 |
| 1.3 HIPÓTESE | 36 |
| 1.4 OBJETIVOS | 37 |
| 1.4.1 Objetivo geral:..... | 37 |
| 1.4.2 Objetivos específicos: | 37 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 2.1 Desenho de acoplamento molecular <i>in silico</i> : alvo e preparação de ligantes envolvendo TLRs, TLR4/MD-2 e ivermectina..... | 38 |
| 2.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT) | 40 |
| 2.3 Inibição do complexo TLR4/MD-2, tratamento com ivermectina e ativação de NF- κ B..... | 40 |
| 2.4 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (<i>Bone marrow-derived macrophage</i> – BMDM) | 41 |
| 2.5 Cultivo da estirpe de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PA14..... | 42 |
| 2.6 Inibição de TLR-4/MD2, tratamento com ivermectina e infecção com PA14 em BMDM | 42 |
| 2.7 Dosagem de lactato e glicose de BMDM inibidos, estimulados e/ou infectados com PA14..... | 44 |
| 2.8 Camundongos e comitê de ética | 45 |
| 2.9 Tratamento com ivermectina; grupos experimentais e infecção intratraqueal com PA14 | 45 |
| 2.10 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) | 46 |
| 2.11 Dosagem de óxido nítrico (NO) | 47 |
| 2.12 Processamento histológico pulmonar e análise histopatológica | 47 |
| 2.13 Análise estereológica e histomorfométrica pulmonar | 48 |
| 2.14 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) | 48 |
| 2.15 Análise da marcação CD4/IL17A e CD4/IFN γ por citometria de fluxo..... | 49 |
| 2.16 Análise estatística | 50 |
| 3.0 RESULTADOS | 52 |

| | |
|---|------------|
| 3.1 A ivermectina liga-se ao correceptor MD-2 do TLR4 com alta afinidade e a todos os TLRs com intensidade semelhante | 52 |
| 3.2 A ivermectina amplifica a ativação do NF-κB em macrófagos, mas reduz a secreção de TNF-α, com reversão desse efeito pela inibição do complexo TLR4/MD-2 | 57 |
| 3.3 A ivermectina prejudica a secreção de NO e TNF-α e a eliminação de <i>P. aeruginosa</i> em BMDM, com reversão do efeito após a inibição do complexo TLR4/MD-2 | 61 |
| 3.4 O tratamento com ivermectina diminuiu a carga bacteriana pulmonar em camundongos TLR4 ^{-/-} infectados com PA14, mas não em camundongos selvagens | 68 |
| 3.5 O tratamento com ivermectina atenua os danos pulmonares e reduz o infiltrado inflamatório em camundongos infectados com <i>P. aeruginosa</i> | 72 |
| 3.6 O tratamento com ivermectina reduziu a secreção de IL-6 e TNF-α e aumentou a secreção de IFN-γ e IL-17A nos pulmões de camundongos C57BL/6, com efeitos mais evidentes em camundongos TLR4 ^{-/-} | 76 |
| 4.0 DISCUSSÃO | 81 |
| 5.0 CONCLUSÃO | 88 |
| 6.0 REFERÊNCIAS..... | 91 |
| 7.0 APÊNDICE A – ARTIGO DESTA TESE DE DOUTORADO..... | 105 |

1.0 INTRODUÇÃO

A ivermectina é um fármaco antiparasitário endectocida de amplo espectro, com ampla margem de segurança em mamíferos. Este fármaco é amplamente utilizado no tratamento de infecções parasitárias humanas e veterinárias, onde se liga a canais de cloreto dependentes de glutamato, levando à hiperpolarização celular, paralisia e morte do parasita (CRUMP, 2017). Nos últimos anos, aplicações terapêuticas adicionais para a ivermectina têm sido propostas, incluindo a modulação de canais iônicos. Khakh e colaboradores (1999) demonstraram que a ivermectina atua como um modulador alostérico positivo dos receptores P2X4, que são canais catiônicos não seletivos ativados por adenosina trifosfato (ATP) extracelular (KHALH *et al.*, 1990. Csóka e colaboradores (2018) mostraram que a ivermectina, em associação com ATP, aumentou a depuração de *Escherichia coli* por macrófagos, melhorou a sobrevivência em camundongos sob condições de septicemia e reduziu o dano tecidual geral, em especial nos rins, com a diminuição dos níveis plasmáticos de uréia (CZÓKA *et al.*, 2018). Apesar desses achados, o papel direto da ivermectina em células da imunidade inata permanece incompletamente compreendido.

Os macrófagos são células fagocíticas envolvidas na resposta imune inata e são ativados por padrões moleculares associados a patógenos, como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (SUDA *et al.*, 1995; TOBIAS *et al.*, 1992). O LPS interage com o receptor Toll-like 4 (TLR4) e sua proteína acessória, a proteína de diferenciação mieloide 2 (MD-2), iniciando cascatas de sinalização intracelular que ativam fatores de transcrição como o NF- κ B e, por fim, induzem a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (WANG *et al.*, 2016; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015; ZOU; SHANKAR, 2015; SU *et al.*, 2018). A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa reconhecida pelos receptores TLR4 e TLR5 por meio do LPS e da flagelina, respectivamente (GELLATLI; HANCOK; 2013). Trata-se de um patógeno oportunista clinicamente relevante, frequentemente associado a infecções pulmonares graves e a cepas multirresistentes, tendo sido designado pela Organização Mundial da Saúde como prioritário para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; BEM *et al.*, 2023; BUCIOR; PIELAGE; ENGEL, 2012; RAOST *et al.*, 2009).

Evidências da literatura demonstraram que o tratamento contínuo com ivermectina induz disbiose intestinal em animais (BELO *et al.*, 2023; BELO *et al.*, 2025;

CHEN *et al.*, 2024). Condições disbióticas estão fortemente associadas à modulação do eixo intestino–pulmão, aumentando a suscetibilidade à pneumonia por *P. aeruginosa* em camundongos (ROSA *et al.*, 2020; SANTANA *et al.*, 2022). No entanto, em contraste com essa hipótese, animais tratados com ivermectina em estudos anteriores não apresentaram aumento da suscetibilidade à infecção (BELO *et al.*, 2023). Zhang e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com ivermectina melhorou a sobrevivência de camundongos após a administração de uma dose letal de LPS, por meio da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias via bloqueio da sinalização de NF- κ B. Esses autores também mostraram que a ivermectina suprimiu a produção de óxido nítrico e prostaglandina E₂ em macrófagos RAW 264.7 desafiados com LPS (ZHANG *et al.*, 2009). Em conjunto, esses achados sugerem que, apesar de um estado disbiótico intestinal, a ivermectina pode exercer efeito imunomodulador, atenuando respostas inflamatórias exacerbadas sem necessariamente comprometer a defesa contra infecções.

Assim, considerando a informação limitada na literatura especializada sobre o impacto imunofisiológico da ivermectina em macrófagos infectados por bactérias extracelulares, ou sobre sua interação com padrões moleculares associados a patógenos capazes de potencializar ou suprimir a ativação imune, este estudo investigou a ligação da ivermectina à MD-2 no contexto do complexo TLR4/MD-2. Nossos achados demonstram que a ivermectina atua como um potencial imunomodulador da resposta inflamatória, preenchendo uma lacuna crítica no conhecimento disponível e estendendo os trabalhos de Zhang e colaboradores (2008; 2009), que relataram os efeitos do tratamento com ivermectina *in vitro* e *in vivo* utilizando células ou animais desafiados com LPS.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* E RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria patogênica oportunista cuja relevância clínica deriva de sua elevada adaptabilidade ambiental, característica que a classifica como uma bactéria ubíqua, sendo considerada em 2017 como uma das bactérias de maior risco à vida e listada pela Organização Mundial da Saúde como prioritária para a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (OMS, 2017; QUIN *et al.*, 2022). Pertencente à família *Pseudomonadaceae*, trata-se de um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose, com um arsenal diversificado de fatores de virulência que permitem a evasão do sistema imunológico e a subversão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (LIAO *et al.*, 2022). Esta bactéria é denominada *P. aeruginosa*, uma vez que se encontra disposta em pares, que se assemelham a uma célula única cilíndrica quando visualizada ao microscópio óptico convencional, e, em sua colônia macroscópica, encontram-se pigmentos azul-amarelados, assemelhando-se à coloração esverdeada (*pseudo* = falso; *monas* = uma unidade; *aeruginosa* = cheia de ferrugem de cobre ou verde) (HOFMANN *et al.*, 2021).

O genoma de *P. aeruginosa* possui grande tamanho, sendo um dos maiores dentre os procaríotos, no qual codifica aproximadamente 5.567 genes, com a presença de múltiplos sistemas regulatórios, regulados por cerca de 468 genes reguladores, que permitem que *P. aeruginosa* reorganize rapidamente seu comportamento em resposta a estresses exógenos, estímulos celulares e sinais produzidos pela própria população bacteriana, como, por exemplo, a comunicação por *quorum sensing* bacteriano (sendo exemplos a guanosina monofosfato cíclico-di (c-di-GMP), responsável pela adesão inicial à mucosa; *LasI* e *LasR*, genes que atuam regulando, por exemplo, a formação do biofilme; ou *RhlR* e *RhlI*, que controlam sua dispersão, além dos ramnolipídeos), resultando em infecções de alta complexidade fisiopatológica, podendo conduzir o paciente infectado a óbito (KLOCKGETHER *et al.*, 2011; STOVER *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2025; MUKHERJEE *et al.*, 2017).

Embora seja amplamente distribuída na água, no solo, em superfícies orgânicas úmidas e, majoritariamente, no ambiente nosocomial hospitalar, sua presença em tecidos humanos é quase sempre reflexo do comprometimento prévio da barreira epitelial, de alterações no muco respiratório, de estado imunodepressivo

ou do uso de dispositivos invasivos, como respiradores (MUGGEO; CORAUX; GUILLARD, 2023; VERDIAL *et al.*, 2023). No pulmão, essas condições constituem um ambiente altamente permissivo, no qual a bactéria encontra substrato suficiente para adesão, expansão, alteração fenotípica e persistência de forma crônica, especialmente quando o paciente possui comorbidades associadas que comprometem as defesas pulmonares e o *clearance* mucociliar, como a fibrose cística (FC), uma doença pulmonar monogênica autossômica grave ocasionada por mutações no gene *CFTR*, na qual o portador apresenta acúmulo de muco nos pulmões, ou a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (NICKERSON *et al.*, 2024).

Um dos principais sítios de infecção da *P. aeruginosa* é o tecido pulmonar, no qual o processo infeccioso se inicia por mecanismos de adesão mediados por flagelo, lipopolissacarídeo (LPS), alginato e pili do tipo IV, facilitando a aproximação e a fixação da bactéria ao epitélio respiratório, especialmente quando este se encontra danificado ou recoberto por muco espesso, como em FC, bronquiectasias ou estados de ventilação mecânica (ZHANG *et al.*, 2025; WOOD *et al.*, 2023). A motilidade inicial, proporcionada pelo flagelo, permite que as células bacterianas alcancem regiões profundas da árvore brônquica, mas, à medida que a infecção progride, muitas cepas de *P. aeruginosa* reduzem a expressão dessa estrutura com o intuito de diminuir o reconhecimento pelo sistema imunológico, dado que a flagelina é um dos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), o qual ativa fortemente receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores semelhantes a Toll (TLRs) do tipo 5 (TLR5) (LORENZ *et al.*, 2018). Ademais, a atividade endotóxica do LPS, fortemente reconhecida pelo TLR4, participa desse processo na etapa inicial da infecção, em associação com o alginato, um exopolissacarídeo mucoide que atua na proteção frente a componentes antibacterianos do hospedeiro e auxilia a bactéria na evasão da fagocitose (GOLDBERG; PER, 1996; LIAO *et al.*, 2022). A partir do momento em que atinge a superfície epitelial, *P. aeruginosa* codifica um repertório de fatores de virulência extracelulares que ampliam sua capacidade de invasão. Entre esses fatores de virulência, os dependentes de elastases atuam degradando componentes estruturais do epitélio, modulam proteínas de junção celular, lisam hemácias e enfraquecem o movimento de varredura ciliar, comprometendo a depuração mucociliar e produzindo, assim, lesões no parênquima pulmonar, denominadas ectima gangrenoso (CASILAG *et al.*, 2016; PRASAD *et al.*, 2020). A

piocianina, um metabólito característico da espécie responsável por catalisar a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, intensifica o estresse oxidativo, induz disfunção mitocondrial e reduz a viabilidade de células epiteliais, além de estimular a secreção de interleucina 8 (IL-8), responsável pela quimiotaxia de neutrófilos (DENNING *et al.*, 1998). Ademais, a pioverdina, responsável pela coloração verde macroscópica característica da colônia, atua como sideróforo na captação de ferro, além de regular fatores de virulência importantes, como a exotoxina A, que atua majoritariamente na interrupção da síntese proteica (LAMONT *et al.*, 2002; BONNEAU; ROCHE; SCHALK, 2020).

O sistema de secreção do tipo III exerce papel fundamental no agravamento da infecção por *P. aeruginosa*, no qual são liberadas toxinas intracelulares nas células hospedeiras, interferindo na capacidade de fagocitose e na integridade da barreira epitelial (FOULKES *et al.*, 2019). Exotoxinas, como a ExoU, encontrada em cepas mais virulentas, desencadeiam necrose rápida e ativação inflamatória local; ExoS e ExoT prejudicam a reestruturação do citoesqueleto, bloqueiam a fagocitose e comprometem a capacidade de reparo do epitélio; ExoY altera vias de sinalização e a integridade celular (HARDY *et al.*, 2021; SAWA *et al.*, 2014). Em conjunto, esses elementos prejudicam a capacidade do hospedeiro de controlar a infecção ainda no estágio inicial, favorecendo a expansão bacteriana para áreas adjacentes do parênquima.

A partir do momento em que se estabelece a infecção, a população bacteriana passa a reorganizar seu comportamento e a codificação diferencial de genes com o intuito à formação de biofilmes, no qual favorece a sua permanência no hospedeiro (THI; WIBOWO; REHM, 2020). O biofilme de *P. aeruginosa* emerge de uma transição programada entre motilidade e adesão, governada por uma integração entre a sinalização por c-di-GMP, estruturas de superfície e produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (HA; O'TOOLE, 2015). Inicialmente, células planctônicas reconhecem a superfície a ser aderida por meio do flagelo e de pili do tipo IV, em associação com o aumento local de c-di-GMP, controlado por diguanilato ciclases (DGCs), como SadC, e fosfodiesterases (PDEs), como BifA, que reprimem a motilidade e induzem a adesão irreversível de *P. aeruginosa*, sustentada principalmente por Psl e Pel, que são polímeros exopolissacarídicos que se ancoram à célula e iniciam a arquitetura tridimensional do biofilme (HA; O'TOOLE, 2015; ZHANG *et al.*, 2025). À medida que microcolônias evoluem para estruturas mais

complexas, o biofilme passa a depender mais fortemente da matriz rica em exopolissacarídeos (Psl, Pel e, em cepas mucoides, o alginato, como mencionado previamente), além de DNA extracelular (eDNA), liberado por lise celular programada, que confere estabilidade, promove agregação e modula quimicamente o microambiente, acidificando-o e limitando a penetração de antimicrobianos no biofilme (MA *et al.*, 2022). Esse sistema é reforçado pelo sistema de comunicação *quorum sensing*, cujo circuito hierárquico (Las e Rhl) coordena a expressão de fatores de virulência e a maturação do biofilme; ao mesmo tempo, a dispersão do biofilme inicia-se pela queda de c-di-GMP e pela degradação de eDNA, liberando, assim, células planctônicas para reiniciar a colonização em novos nichos (SARKAR, 2020).

O biofilme oferece vantagens significativas, pois protege a colônia contra antibióticos, reduz a ação de fagócitos e impede a difusão de moléculas solúveis do sistema imune sobre o microrganismo (THI; WIBOWO; REHM, 2020). Além disso, as bactérias em biofilme apresentam metabolismo diminuído quando comparadas ao estado planctônico, favorecendo a cronicidade da infecção no hospedeiro (SOARES; ALEXANDRE; ETIENNE, 2020). A transição para o fenótipo mucoide, por exemplo, caracterizada pelo aumento da produção de alginato, é um evento marcante em infecções crônicas de *P. aeruginosa*, como na FC, e constitui um dos maiores desafios terapêuticos, uma vez que essas cepas apresentam elevada resistência intrínseca e menor imunogenicidade (BOUCHER *et al.*, 1997; MALHOTRA *et al.*, 2018).

A resistência aos antibacterianos em *P. aeruginosa* é resultado da convergência de múltiplos mecanismos intrínsecos de resistência antimicrobiana, incluindo a baixa permeabilidade da membrana externa aos antibióticos, associada à escassez de porinas inespecíficas, e a expressão constitutiva de sistemas de efluxo multidroga, especialmente o MexAB-OprM (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019). Soma-se a isso a produção da β -lactamase cromossômica *AmpC*, que contribui para a inativação de β -lactâmicos. Em conjunto, esses mecanismos conferem baixa suscetibilidade basal a múltiplas classes de antibióticos, refletindo a elevada plasticidade genômica e a forte capacidade adaptativa da espécie sob pressão seletiva (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; TSAI *et al.*, 2025). A resistência adquirida é predominantemente mediada por mutações cromossômicas, como a inativação de *oprD* na resistência a carbapenêmicos, alterações em *gyrA/parC* frente às fluoroquinolonas e mutações regulatórias que levam à superexpressão de bombas de efluxo, além da transferência horizontal de plasmídeos (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; LEE; KO, 2012;

POOLE, 2011). Esse contexto é acentuado na presença de biofilmes, denominado resistência adaptativa, nos quais fatores físicos e fisiológicos, como gradientes de oxigênio e nutrientes, sequestro de antibióticos pela matriz extracelular e presença de subpopulações metabolicamente inativas, promovem tolerância transitória, criando um ambiente permissivo para a seleção e fixação de mutações de resistência aos antibacterianos (FERNÁNDEZ-BILLÓN *et al.*, 2023; SINDELDECKER; STOODLEY, 2021).

A interação entre *P. aeruginosa* e o sistema imune, especialmente nos pulmões, é marcada por um desequilíbrio constante entre a tentativa do sistema imune de controlar a bactéria e o dano colateral causado pela própria resposta inflamatória ao epitélio pulmonar (LIN; KAZMIERCZAK, 2017). O reconhecimento inicial ocorre principalmente por meio de PRRs presentes no epitélio respiratório e em células imunológicas, como macrófagos alveolares (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Os macrófagos compreendem um grupo celular fagocítico que compõe a linha de frente da defesa do hospedeiro quando este reconhece PAMPs durante processos infecciosos (GALLI; SALEH, 2020). Um dos PAMPs mais estudados atualmente na ativação dessas vias de sinalização intracelular em células imunológicas, que resulta na eliminação eficaz de *P. aeruginosa*, é o LPS, presente em sua membrana externa, que interage com o complexo formado por TLR4 (*Toll-like receptor 4*) e a proteína acessória fator de diferenciação mielóide 2 (*myeloid differentiation factor 2* – MD-2) (WANG *et al.*, 2016).

O MD-2 atua como regulador central da resposta imune inata mediada por TLR4, constituindo a subunidade acessória responsável pelo reconhecimento direto do lipopolissacarídeo (LPS) e pela ativação subsequente da sinalização inflamatória em células imunes, como macrófagos (SHIMAZU *et al.*, 1999). A associação física do MD-2 ao domínio extracelular do TLR4 induz responsividade ao LPS, uma vez que o TLR4 isolado é incapaz de reconhecer esse PAMP ou iniciar qualquer tipo de sinalização intracelular (AKASHI *et al.*, 2000). Além disso, o MD-2 é determinante para o correto tráfego do TLR4 até a membrana plasmática, visto que, na ausência desse correceptor, o TLR4 permanece retido no complexo de Golgi, e os macrófagos tornam-se refratários à estimulação por LPS. A formação do complexo TLR4/MD-2 na superfície de macrófagos viabiliza a ativação de vias de sinalização intracelular, permitindo que essas células se tornem responsivas ao ligante, como, por exemplo, a via do fator nuclear kappa B (NF-κB) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos

(MAPKs), culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (NAGAI *et al.*, 2002; BAI *et al.*, 2023). Além do reconhecimento do ligante, o MD-2 é determinante para o correto tráfego do TLR4 até a membrana plasmática, uma vez que a formação do complexo TLR4/MD-2 ocorre no retículo endoplasmático e é necessária para a exportação eficiente do receptor. Na ausência de MD-2, o TLR4 permanece retido no complexo de Golgi, tornando macrófagos refratários à estimulação por LPS (NAGAI *et al.*, 2002). Ademais, resíduos específicos de aminoácidos do MD-2, como Lys128 e Lys132, participam da interação com o LPS e contribuem para a estabilização do complexo dimérico ativo (VISINTIN *et al.*, 2003). Adicionalmente, formas solúveis de MD-2 podem ser detectadas no meio extracelular e ampliam o espectro funcional do TLR4 ao formar complexos com LPS, permitindo a ativação de células que expressam TLR4, mas não MD-2 constitutivamente, como células epiteliais, além de exercer função opsonizante sobre bactérias Gram-negativas de maneira dependente da integridade da via TLR4 (VISINTIN *et al.*, 2001; KENNEDY *et al.*, 2004; JAIN *et al.*, 2008).

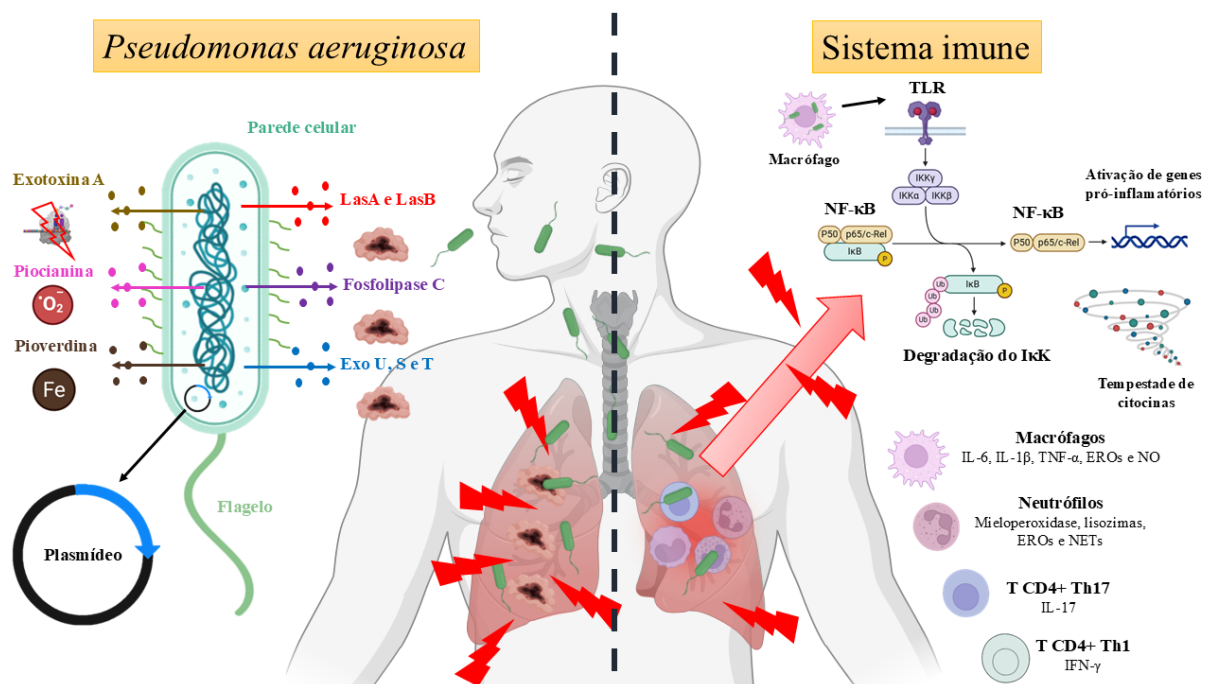
Dessa forma, o reconhecimento de PAMPs por TLRs e a ativação de cascatas de sinalização intracelular culminam na liberação de fatores de transcrição, conduzindo à expressão de genes codificadores envolvidos na produção e posterior secreção de citocinas e quimiocinas no meio extracelular, além de promover a expressão de moléculas coestimuladoras e imunomodulatórias na superfície de fagócitos, como CD80/CD86, também conhecidas como B7-1/B7-2, que atuam na inflamação aguda e na estimulação da imunidade adaptativa (VAROL; MILDNER; JUNG, 2015; ZOU; SHANKAR, 2015). Uma das vias mediadoras da resposta inflamatória em macrófagos é a MAPK, pertencente à família de proteínas quinases de serina/treonina, as quais, quando ativadas, fosforilam substratos e fatores de transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória por meio de quinases reguladas por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase* – ERKs), quinases N-terminais c-Jun (*c-Jun NH₂-terminal kinase* – JNKs), quinases ativadas por estresse (*stress-activated protein kinases* – SAPKs) e a p38 MAPK (CARGNELLO; ROUX, 2011). Intimamente relacionada a essa via, tem-se a via NF- κ B, na qual o estímulo de PRRs, como TLRs, conduz essa cascata de sinalização, culminando na ativação de fatores de transcrição de genes pró-inflamatórios (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016).

A ativação da via canônica do NF- κ B inicia-se quando o LPS de *P. aeruginosa* forma um complexo com proteínas ligantes ao LPS no meio extracelular, sendo então transferido para o CD14, que facilita sua entrega ao complexo TLR4/MD-2 na membrana plasmática (GUHA; MACKMAN, 2001; LIU *et al.*, 2021). A ligação do LPS promove a dimerização do TLR4 e a ativação do domínio citoplasmático TIR, desencadeando o recrutamento sequencial do adaptador MyD88 e das quinases IRAK4 e IRAK1, que se associam ao fator TRAF6 (PÅLSSON-McDERMOTT; O'NEILL, 2004). Esse complexo sinalizador leva à ativação da quinase TAK1, que, por sua vez, fosforila o complexo IKK (IKK α /IKK β /NEMO), resultando na fosforilação da proteína inibitória I κ B α (GUHA; MACKMAN, 2001; KIM *et al.*, 2023; PEREIRA *et al.*, 2022). A fosforilação de I κ B α promove sua ubiquitinação e degradação proteossomal, liberando os dímeros de NF- κ B, predominantemente p50/p65, que se translocam para o núcleo (ALKALAY *et al.*, 1995). No núcleo, o NF- κ B liga-se a elementos κ B em regiões promotoras de genes-alvo, induzindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, além de enzimas efetoras, como iNOS, receptores de citocinas, fatores antimicrobianos e moléculas de adesão, convergindo para o aumento da efetividade do sistema imunológico no reconhecimento e combate a *P. aeruginosa* (TUKHVATULIN *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2013). Paralelamente, a ativação do TLR4 também estimula vias MAPK dependentes de ERK, JNK e p38, que cooperam com o NF- κ B na amplificação da resposta inflamatória. Esse eixo de sinalização é rigidamente regulado por mecanismos de *feedback* negativo, incluindo a ressíntese de I κ B α , garantindo o controle temporal da ativação inflamatória induzida pelo LPS (ZHANG *et al.*, 2025; ZHOU *et al.*, 2021). A ativação dos inflamassomas, particularmente NLRP3 e NLRC4, ocorre de forma correlacionada, intensificando a ativação da caspase-1 e a liberação de IL-1 β , o que promove piroptose e recrutamento adicional de neutrófilos (FU; WU, 2023; CHEN *et al.*, 2014).

Os neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimórfonucleares, representam uma importante linha efetora da imunidade inata contra a *P. aeruginosa*, sobretudo nas primeiras 24 a 48 horas (KOH *et al.*, 2009). Sua ação baseia-se na liberação de substâncias presentes em seus grânulos, que se dividem em grânulos específicos, contendo lisozimas, elastase e colagenase, e grânulos azurofílicos, que contêm substâncias microbidas, como espécies reativas de oxigênio, mieloperoxidase e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (CHAPPLE *et al.*,

2023). Embora essa resposta seja eficaz contra bactérias planctônicas, ela se torna insuficiente contra biofilmes. As NETs aderem à matriz sem destruí-la; as proteases liberadas por neutrófilos contribuem para a degradação de colágeno e elastina no parênquima; e a infiltração neutrofílica massiva estreita as vias aéreas e compromete a função pulmonar, sendo então a principal função das NETs imobilizar e eliminar microrganismos que se encontram no ambiente extracelular (RIZAKOS; GEDDES-MCALISTER, 2025). A própria persistência dos neutrófilos alimenta um processo inflamatório prolongado que não resulta em eliminação bacteriana, mas amplia a destruição pulmonar (SKOPELJA-GARDNER *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2024). A Figura 1 resume de forma integrada os principais fatores de virulência da *P. aeruginosa* e as vias imunoinflamatórias ativadas em células imunes inatas no tecido pulmonar, como macrófagos (Figura 1).

Figura 1 – Interação entre fatores de virulência da *P. aeruginosa* e a resposta imunoinflamatória pulmonar.



Legenda: Representação esquemática dos principais fatores de virulência bacterianos, incluindo exotoxinas, proteases, sideróforos, sistemas de secreção e plasmídeo de resistência, bem como dos mecanismos de reconhecimento imunológico mediados por receptores do tipo *Toll* (TLRs), ativação de vias de sinalização, como NF-κB, produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células efetoras, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ (Th1 e Th17), culminando em inflamação persistente e dano ao parênquima pulmonar. Fonte: do autor (2026).

Quando a infecção persiste além dos estágios iniciais, a resposta imunológica adaptativa é estabelecida e passa a ter relevância no contexto imunoinflamatório. Entre os subconjuntos de linfócitos T, o eixo Th17, um perfil de linfócitos T auxiliares CD4⁺ dependente dos fatores de transcrição ROR γ T e STAT3, desempenha papel crucial na infecção por *P. aeruginosa* (BAYES; RITCHIE; EVANS, 2016; MOSER *et al.*, 2021). A IL-17, secretada por essas células, promove o recrutamento contínuo de neutrófilos por meio do estímulo à produção de quimiocinas, incluindo IL-8, reforça as barreiras epiteliais e estimula a produção de peptídeos antimicrobianos, como defensinas (LIU *et al.*, 2011). No entanto, a ativação prolongada desse eixo contribui para inflamação crônica e remodelamento tecidual, transformando uma resposta inicialmente protetora em uma atividade imunoinflamatória danosa ao organismo. O eixo de linfócitos T CD4⁺ Th1, dependente dos fatores de transcrição T-BET, STAT1 e STAT4, também participa desse processo, principalmente por meio da produção de IFN- γ , que aumenta a atividade microbicida de macrófagos ao elevar a produção de espécies reativas, como óxido nítrico, além de intensificar a secreção de citocinas pró-inflamatórias inatas e a expressão de moléculas coestimuladoras B7 e de MHC (MOSER *et al.*, 2021; HAZLETT, 2002).

Contudo, mesmo diante dessa resposta imune efetora, frente a biofilmes maduros, sua eficácia é limitada. A produção de anticorpos específicos contra componentes bacterianos ocorre majoritariamente na forma de isotipos IgA, sobretudo os subtipos IgA1 e IgA2, que atuam em mucosas, mas apresentam impacto restrito na eliminação da infecção, dada a dificuldade de penetração no biofilme e a neutralização dos anticorpos por proteases bacterianas, como a elastase B, que cliva a região Fab do anticorpo comprometendo sua função efetora, além da protease IV e da protease alcalina (AprA) (ZHOU *et al.*, 2023; KAGEYAMA *et al.*, 2024; MUCH *et al.*, 2018; SAHU; RUHAL, 2025).

O desfecho da infecção pulmonar por *P. aeruginosa* é determinado tanto pela quantidade de células bacterianas com as quais o hospedeiro entra em contato quanto pelos fatores de virulência e pela incapacidade do sistema imune de resolver a infecção sem provocar dano significativo ao parênquima pulmonar, o que idealmente ocorreria por meio de uma resposta imunológica regulada de forma homeostática (QUIN *et al.*, 2022). O infiltrado neutrofílico persistente, a liberação contínua de proteases e espécies reativas, o espessamento septal e a perda da integridade

alveolar caracterizam um processo de destruição progressiva que, a longo prazo, compromete irreversivelmente a função pulmonar (NICKERSON *et al.*, 2024). Assim, o pulmão infectado por *P. aeruginosa* é marcado por hipóxia, acúmulo de muco e remodelamento estrutural, contexto no qual a bactéria encontra condições ideais para persistir de forma crônica, agravando o prognóstico clínico ou, em apresentações agudas, conduzindo o paciente a um prognóstico reservado (WLLIANS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010).

Portanto, a interação entre *P. aeruginosa* e o sistema imune pulmonar representa um modelo que necessita ser estudado a fim de se alcançar novas formas de tratamento para indivíduos infectados por essa bactéria, tanto em quadros agudos quanto crônicos de pneumonia. Compreender essa dinâmica, desde as vias de reconhecimento inicial até a persistência mediada por biofilmes e a desregulação da resposta imunológica, é fundamental para elucidar a fisiopatologia da infecção e orientar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.1.2 IVERMECTINA: DE UM ANTIPARASITÁRIO À IMUNOMODULAÇÃO E APLICAÇÃO EM OUTROS CONTEXTOS PATOLÓGICOS

A ivermectina é um fármaco antiparasitário endectocida macrolídeo de amplo espectro, amplamente utilizado no tratamento de diversas parasitoses humanas e veterinárias, cuja introdução clínica representou um marco no controle de infecções por nematódeos e ectoparasitas, contemplando seus descobridores Satoshi Ōmura e William C. Campbell com o Prêmio Nobel de Fisiologia em 2015 (CRUMP, 2017). Trata-se de um derivado semissintético das avermectinas, compostos macrocíclicos isolados originalmente a partir da fermentação de *Streptomyces avermitilis* (CRUMP, 2017). A ivermectina apresenta elevada eficácia terapêutica associada a uma ampla margem de segurança, o que possibilitou sua utilização em larga escala, inclusive em programas de administração em massa voltados à erradicação de doenças tropicais negligenciadas, como a oncocercose. Em 1987 a ivermectina foi inserida no programa de controle da oncocercose (OCP), que abrangeu a região da África Ocidental, e nos anos 2000, no programa global para eliminar a filariose linfática (GPELF/OMS), no qual a ivermectina foi administrada juntamente com o antiparasitário albendazol (MARTIN *et al.*, 2020; FISCHER *et al.*, 2017; WHITE *et al.*, 1987).

O mecanismo de ação antiparasitário da ivermectina envolve a interrupção da neurotransmissão em invertebrados por meio da ativação de canais de cloreto controlados por ligantes, particularmente aqueles regulados por glutamato (CRUMP, 2017). A ligação da ivermectina a esses canais promove influxo de íons cloreto, resultando em hiperpolarização da membrana neuronal e muscular, paralisia flácida e morte do parasita (JOHNSON-ARBOR, 2022). Além disso, o fármaco pode interagir com receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), potencializando ainda mais a inibição da atividade neuromuscular (JOHNSON-ARBOR, 2022). Em vertebrados, a ausência de canais de cloreto controlados por glutamato e a restrição da ivermectina à periferia, em função de sua baixa penetração pela barreira hematoencefálica mediada pela glicoproteína-P, impedem que o fármaco atinja o sistema nervoso central (SNC), além de não exercer efeitos sobre os receptores de GABA, uma vez que estes se concentram integralmente no SNC (WOLSTENHOLME; ROGERS, 2006).

A ivermectina é administrada por via oral em humanos e apresenta absorção relativamente lenta. Após a absorção, distribui-se amplamente pelo organismo por meio da corrente sanguínea, apresentando elevada taxa de ligação a proteínas plasmáticas (aproximadamente 93%) e acentuada lipossolubilidade, o que lhe confere amplo volume de distribuição e acúmulo preferencial em tecidos adiposos (KLOTZ; OGBUOKIRI; OKONKWO, 1990; CRUMP, 2017). As concentrações plasmáticas máximas são atingidas, em média, entre 4 e 5 horas após a administração, enquanto a meia-vida plasmática varia, na maioria dos estudos, entre 18 e 40 horas, podendo sofrer influência de fatores individuais, como peso corporal, composição corporal e função hepática (CANGA *et al.*, 2008). A metabolização ocorre predominantemente no fígado, mediada principalmente pelas isoenzimas CYP3A4 e, em menor extensão, CYP3A5 do citocromo P450, resultando na formação de metabólitos hidroxilados e O-desmetilados detectáveis na circulação sistêmica (RENDIC, 2021). A eliminação dá-se quase exclusivamente por excreção biliar, com posterior eliminação fecal, correspondendo a cerca de 99% da dose administrada ao longo de aproximadamente 12 dias, sendo a excreção urinária mínima (SINGH *et al.*, 2022). Esse perfil farmacocinético, caracterizado por elevada lipossolubilidade, extensa distribuição tecidual, metabolismo hepático oxidativo e excreção predominantemente biliar/fecal, sustenta sua eficácia como agente endectocida e fundamenta seu uso em esquemas de dose única em programas de administração em massa.

Apesar da ivermectina ter sido inicialmente proposta e utilizada como antiparasitário, observações de estudos recentes indicaram que a ivermectina apresenta efeitos biológicos adicionais, sugerindo uma atuação que vai além do efeito neuroparasitológico clássico da droga sobre endo e ectoparasitas (KAUR; BLAVO; PARMAR, 2024). Assim, o reposicionamento farmacológico da ivermectina passou a ser investigado em diferentes condições patológicas, inflamatórias e infecciosas, incluindo infecções virais, doenças inflamatórias e processos neoplásicos (KAUR; BLAVO; PARMAR, 2024). Embora esses efeitos não sejam uniformes, sendo observados em estudos *in vitro* e *in vivo*, a consistência de determinados achados experimentais impulsionou o interesse em compreender os mecanismos celulares subjacentes a essas ações pleiotrópicas (ATMAKURI *et al.*, 2023).

No âmbito das infecções virais, estudos *in vitro* demonstraram que a ivermectina é capaz de inibir a replicação de diversos vírus de RNA e DNA (HEIDARY; GHAREBAGHI, 2020; YANG *et al.*, 2020). Um dos mecanismos mais bem caracterizados envolve a interferência no transporte nucleocitoplasmático mediado pelo complexo importina $\alpha/\beta 1$ (YANG *et al.*, 2020). Wagstaff e colaboradores (2012) demonstraram que a ivermectina atua como um inibidor específico da interação entre importina α e importina $\beta 1$, bloqueando a translocação nuclear de proteínas virais dependentes desse sistema. Esse mecanismo foi descrito em modelos celulares infectados por HIV-1, vírus da dengue, vírus do Nilo Ocidental e influenza, nos quais a inibição da importação nuclear resultou em redução significativa da replicação viral (HEIDARY; GHAREBAGHI, 2020). Além disso, esses efeitos foram observados em concentrações micromolares, frequentemente superiores às concentrações plasmáticas alcançadas com doses terapêuticas convencionais quando administradas oralmente em mamíferos, o que limita a extrapolação direta desses achados para o contexto clínico e para modelos *in vivo* (CALY *et al.*, 2020).

Com o surgimento e a disseminação mundial do SARS-CoV-2 em 2019, diversos pesquisadores sugeriram a utilização da ivermectina como possível opção de tratamento da Covid-19 por reposicionamento farmacológico, pois estudos anteriores com proteínas do SARS-CoV demonstraram um papel fundamental da importina $\alpha/\beta 1$ durante a infecção viral no transporte nucleocitoplasmático das proteínas do nucleocapsídeo (WULAN *et al.*, 2015). Também foi verificado que a proteína viral acessória ORF6 do SARS-CoV atua antagonizando o fator de transcrição STAT1, agindo no sequestro da importina $\alpha/\beta 1$ do retículo endoplasmático

rugoso e do complexo de Golgi (FRIEMAN *et al.*, 2007). Caly e colaboradores (2020) demonstraram *in vitro* que a adição de ivermectina em células Vero-hSLAM, na concentração de 5 μ M, resultou, em 24 horas, em redução de 93% do RNA presente no sobrenadante, relativo aos vírions liberados, e de 99,8% do RNA viral associado às células, relativo aos vírions não empacotados, reduzindo em aproximadamente 5.000 vezes o RNA viral em amostras tratadas com ivermectina por 48 horas, sem toxicidade celular. Dessa forma, durante o período pandêmico, diversos segmentos da sociedade, do governo e da área da saúde, com o intuito de prevenção e tratamento dos infectados pelo SARS-CoV-2, adotaram o uso da ivermectina, mesmo sem estudos com combinações *in vivo*, ensaios clínicos, ensaios controlados randomizados ou estudos de dose-resposta realizados (KAUR *et al.*, 2021; HEIDARY; GHAREBAGHI, 2020; CHOUDHARY; SHARMA, 2020). Por incentivo de órgãos governamentais, a ivermectina entrou no senso comum em diversos países como possível prevenção da Covid-19, sendo amplamente distribuída à população.

Contudo, foi verificado que a dose de ivermectina aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) não é ideal para o tratamento da Covid-19, uma vez que a dose utilizada para obter o resultado de inibição de 50% (IC50) do SARS-CoV-2 *in vitro*, nos estudos de Caly e colaboradores (2020), é 35 vezes maior do que a concentração plasmática máxima da dose aprovada após a administração oral em jejum e, utilizando a dose aprovada de ivermectina, em modelos farmacocinéticos populacionais, não se atinge o IC50, mesmo em níveis 10 vezes maiores (SCHMITH; ZHOU; LOHMER, 2020). Em um estudo clínico randomizado, Mohan e colaboradores (2021) verificaram que a dose única de ivermectina em pacientes com Covid-19 leve e moderada não aumentou significativamente a negatividade do RT-PCR ou a diminuição da carga viral após cinco dias de administração, em comparação com o placebo.

Paralelamente aos estudos antivirais, evidências experimentais começaram a apontar para um impacto direto da ivermectina sobre o sistema imune e sobre o estado pró-inflamatório. Em modelos animais foi sugerido que a ivermectina pode modular respostas imunes celulares e humorais, embora os resultados variassem de acordo com a dose, o modelo experimental e o estado fisiopatológico do hospedeiro. Sajid e colaboradores (2007), ao avaliarem coelhos tratados com ivermectina em diferentes doses, observaram um aumento dose-dependente da hipersensibilidade tardia ao dinitroclorobenzeno, maior atividade fagocítica de macrófagos e elevação de títulos de anticorpos contra eritrócitos de carneiro. Esses achados indicaram que a

ivermectina poderia influenciar parâmetros imunes de forma direta, embora os mecanismos envolvidos permanecessem indefinidos.

Além disso, a ivermectina vem sendo descrita como um fármaco capaz de modificar a microbiota bacteriana intestinal e induzir quadros de disbiose intestinal, sobretudo quando administrada por via oral, com efeitos dependentes da dose, da duração do tratamento e do hospedeiro. Belo e colaboradores (2025), em uma análise integrativa abrangendo modelos pré-clínicos e dados clínicos, demonstraram que a administração oral de ivermectina promoveu alterações significativas na composição e na diversidade da microbiota intestinal eubiótica em diferentes espécies de mamíferos, podendo impactar diretamente sobre o sistema imunológico. Um dos pontos centrais que o estudo evidencia é que esse estado disbiótico induzido pela ivermectina é fortemente dependente da via de administração, sendo praticamente ausente quando a ivermectina é utilizada por vias não orais, reforçando o papel do contato direto do fármaco com o lúmen intestinal (BELO *et al.*, 2025). Além disso, os autores mostram que, embora a disbiose induzida pela ivermectina seja frequentemente transitória, sua recorrência em regimes repetidos ou prolongados pode ter possíveis reflexos metabólicos relevantes, ainda pouco averiguados.

Belo e colaboradores (2023) demonstraram que o tratamento contínuo com ivermectina em camundongos C57BL/6 induziu disbiose bacteriana intestinal e que, embora essa condição disbiótica não tenha aumentado a suscetibilidade à infecção pulmonar aguda por *P. aeruginosa*, o tratamento com ivermectina exacerbou de forma significativa o dano hepático sem, contudo, alterar a recuperação de bactérias viáveis no fígado. Esses dados sugerem que a ivermectina pode influenciar mecanismos imunoinflamatórios hepáticos de maneira dissociada do controle direto da bactéria.

Ademais, a ivermectina vem sendo descrita na literatura como um fármaco com potencial efeito modulador sobre receptores de sistemas purinérgicos. A ivermectina é reconhecida como modulador alostérico positivo do P2X₄, aumentando a sensibilidade do receptor ao trifosfato de adenosina (ATP) extracelular (KHAKH *et al.*, 1999). O P2X₄ é um canal catiônico não seletivo ativado por ATP, amplamente expresso em células do sistema imune inato, incluindo macrófagos e células dendríticas (SLUYTER *et al.*, 2024). A relevância do P2X₄ em quadros inflamatórios também foi demonstrada em modelos de inflamação sistêmica, nos quais a sinalização purinérgica desempenha papel central na amplificação da resposta imune inata (LIU *et al.*, 2024). A liberação maciça de ATP extracelular em tecidos inflamados

atua como estímulo, ativando receptores P2X e P2Y e contribuindo para a produção de citocinas e mediadores inflamatórios. Nesse cenário, a modulação farmacológica do P2X4 pode ter efeitos significativos sobre a intensidade e a duração da resposta inflamatória (KANELLOPOULOS *et al.*, 2021). Csóka e colaboradores demonstraram o impacto da ivermectina nos receptores P2X4 em macrófagos, no qual o tratamento com o fármaco melhorou a sobrevivência de camundongos após a sepse, diminuindo a carga bacteriana e os danos teciduais, além de verificar melhor depuração de *Escherichia coli* por macrófagos estimulados com ivermectina e pulsados com ATP *in vitro* (CSÓKA *et al.*, 2018).

Dados provenientes de modelos de infecção viral reforçam a interpretação de que a ivermectina atua predominantemente modulando a resposta do hospedeiro. No modelo de infecção por SARS-CoV-2 em hamsters, De Melo e colaboradores (2021) demonstraram que a administração de ivermectina em dose antiparasitária padrão não alterou significativamente a carga viral pulmonar, mas reduziu de forma consistente os sinais clínicos da doença e a inflamação das vias aéreas. A análise transcriptômica revelou redução da resposta de interferon do tipo I, diminuição da razão IL-6/IL-10 e indução da polarização de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório (M2), associado à resolução inflamatória e a melhor prognóstico clínico. Esses dados evidenciam que a ivermectina pode imunomodular o organismo em quadros infecciosos e inflamatórios, dissociando o efeito antiviral direto da ivermectina de seus efeitos imunomoduladores *in vivo*.

Por outro lado, estudos em humanos saudáveis indicam que a ivermectina não exerce efeitos imunológicos detectáveis na ausência de inflamação ativa. Wilson, Reaves e Wolstenholme (2021) demonstraram que voluntários tratados com dose única de ivermectina (0,15 mg/kg) não apresentaram alterações significativas em contagens leucocitárias, níveis séricos de citocinas ou expressão gênica em células mononucleares periféricas até 24 horas após a administração. Esses resultados sugerem que a ivermectina não alterou a resposta imunológica nesse contexto de tratamento, indicando que seus efeitos são condicionais ao estado inflamatório do hospedeiro.

Zhang e colaboradores (2008) demonstraram evidências experimentais consistentes de que a ivermectina atua como modulador da resposta inflamatória inata, particularmente em contextos de inflamação induzida pela endotoxina LPS, reduzindo significativamente a mortalidade em um modelo murino de choque

endotóxico. Camundongos tratados com ivermectina apresentaram aumento expressivo da taxa de sobrevivência quando comparados ao grupo controle exposto apenas ao LPS, sendo observada concomitante redução sérica de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6. Em experimentos *in vitro*, macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS exibiram diminuição dose-dependente da produção dessas citocinas quando tratados com ivermectina, sem prejuízo da viabilidade celular nas doses utilizadas, indicando que o efeito observado não se devia à citotoxicidade.

Posteriormente, Zhang e colaboradores (2009) realizaram uma análise mecanística *in vitro*, na qual revelaram que a ivermectina inibe a ativação do fator de transcrição NF- κ B, evidenciada pela retenção citoplasmática da subunidade p65 em macrófagos estimulados por LPS. Considerando o papel central do NF- κ B na regulação da expressão de genes inflamatórios, esse achado posiciona a ivermectina como um modulador direto de um dos principais eixos da imunidade inata. Os autores demonstraram que a ivermectina reduz a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. Essa redução foi acompanhada por diminuição significativa da expressão gênica das enzimas iNOS e COX-2, tanto quando a ivermectina era administrada antes quanto após o estímulo inflamatório, sugerindo potencial efeito terapêutico além do profilático. Adicionalmente, os autores demonstraram que a ivermectina inibe a fosforilação das principais quinases da via MAPK, ERK1/2, p38 e JNK, sem alterar os níveis totais dessas proteínas, indicando interferência específica na ativação da cascata sinalizadora inflamatória.

Em conjunto, esses estudos estabelecem que a ivermectina atua de forma coordenada sobre múltiplos níveis da sinalização inflamatória, interferindo tanto na ativação de MAPKs quanto na transcrição dependente de NF- κ B. No entanto, permaneceu indefinido o alvo molecular primário responsável por essa modulação, bem como a relação entre esses efeitos e outros sistemas de sinalização celular potencialmente afetados pela ivermectina.

1.2 JUSTIFICATIVA:

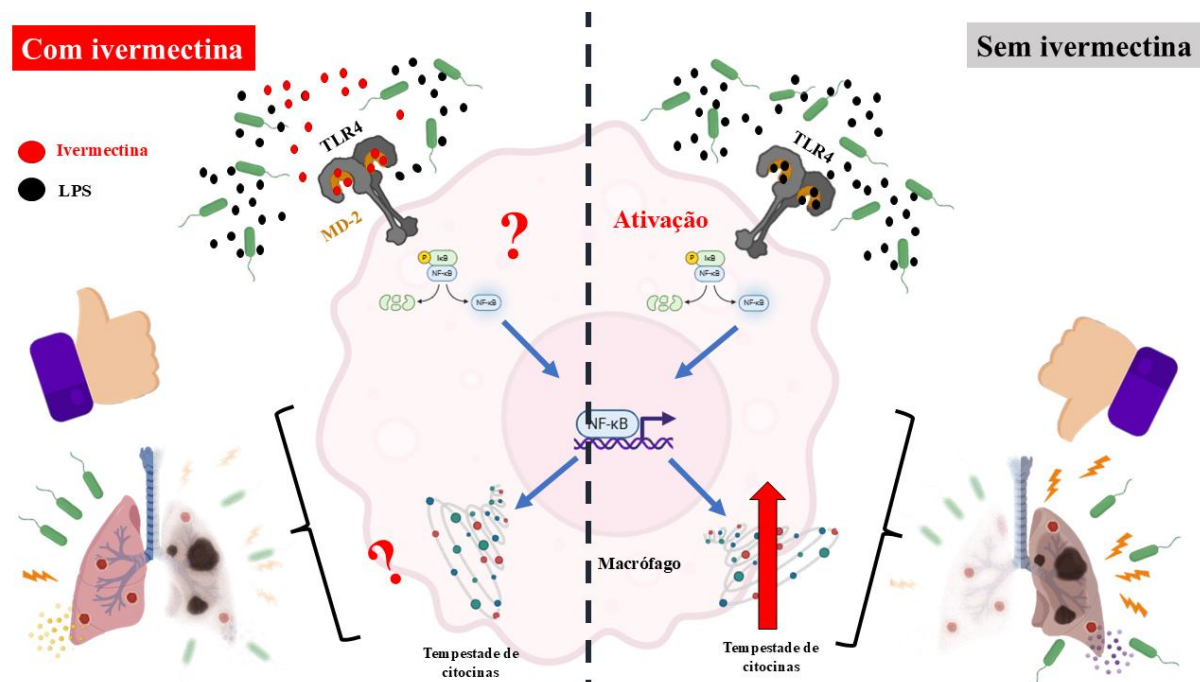
A ivermectina é amplamente utilizada na prática clínica e veterinária devido à sua eficácia antiparasitária e elevada margem de segurança. Apesar disso, evidências acumuladas indicam que seus efeitos biológicos não se restringem apenas à ação sobre parasitas, envolvendo também a modulação de respostas imunológicas, sendo que grande parte dos trabalhos demonstra efeitos do tratamento, mas não esclarece onde especificamente ocorre a ligação da ivermectina que leva à modulação imunofisiológica. Assim, os mecanismos pelos quais a ivermectina interfere na imunidade inata permanecem pouco elucidados, especialmente no contexto de infecções bacterianas agudas, nas quais a ativação adequada da resposta inflamatória é determinante para um bom prognóstico do quadro infeccioso.

Assim, este trabalho se justifica por preencher uma lacuna relevante na compreensão dos efeitos imunofisiológicos da ivermectina, oferecendo uma análise mecanística e funcional de sua ação em modelo murino experimental de pneumonia aguda. Ao esclarecer como esse fármaco modula a resposta imune inata, os achados contribuem para o direcionamento de novos estudos sobre os efeitos da ivermectina, ampliando o entendimento acerca do uso do fármaco em possíveis contextos além da terapêutica antiparasitária.

1.3 HIPÓTESE

A ivermectina liga-se ao correceptor MD-2 do complexo TLR4/MD-2, modulando a sinalização dependente de TLR4 em macrófagos, alterando mecanismos microbicidas *in vitro* e modificando a responsividade do sistema imunológico frente à infecção pulmonar por *P. aeruginosa in vivo*, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 2).

Figura 2 – Hipótese da ação imunomoduladora da ivermectina via complexo TLR4/MD-2 em macrófagos e suas possíveis repercussões na infecção pulmonar por *P. aeruginosa*.



Legenda: Esquema representativo da hipótese de trabalho, no qual a ivermectina interage com o correceptor MD-2 do complexo TLR4/MD-2 em macrófagos, modulando a sinalização dependente de TLR4 e a ativação de vias inflamatórias, como NF-κB. Essa modulação resultaria em alterações nos mecanismos microbicidas e na produção de mediadores inflamatórios *in vitro*, refletindo-se, *in vivo*, em mudanças na resposta imune pulmonar, na carga bacteriana e na evolução da pneumonia aguda induzida por *P. aeruginosa*, de forma dependente da integridade funcional do eixo TLR4/MD-2. Fonte: Elaborada pelo autor (2026).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral:

Investigar o papel da ivermectina sobre o complexo TLR4/MD-2 e as repercussões na resposta imune sistêmica e na evolução da infecção pulmonar aguda por *Pseudomonas aeruginosa* em modelo murino.

1.4.2 Objetivos específicos:

1. Avaliar, por análise *in silico*, a afinidade de ligação da ivermectina aos receptores TLRs e da via canônica de ativação de NF- κ B.
2. Investigar o impacto da ivermectina sobre a ativação da via de sinalização dependente de NF- κ B em macrófagos estimulados por LPS, bem como a participação do complexo TLR4/MD-2 nesse processo.
3. Analisar os efeitos da ivermectina sobre a viabilidade celular, os mecanismos imunofuncionais de macrófagos e o efeito da inibição funcional do complexo TLR4/MD-2, incluindo a depuração intracelular de *P. aeruginosa* e a secreção de mediadores inflamatórios.
4. Avaliar o impacto do tratamento com ivermectina na carga bacteriana pulmonar em um modelo murino de pneumonia aguda por *P. aeruginosa*, em animais selvagens e deficientes para TLR4 (TLR4^{-/-}).
5. Analisar as alterações histopatológicas, inflamatórias e estereológicas do tecido pulmonar associadas ao tratamento com ivermectina durante a infecção bacteriana aguda.
6. Investigar a modulação do perfil de citocinas pulmonares induzida pela ivermectina, com ênfase em mediadores inflamatórios da imunidade inata e em citocinas associadas às respostas imunológicas adaptativas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho de acoplamento molecular *in silico*: alvo e preparação de ligantes envolvendo TLRs, TLR4/MD-2 e ivermectina

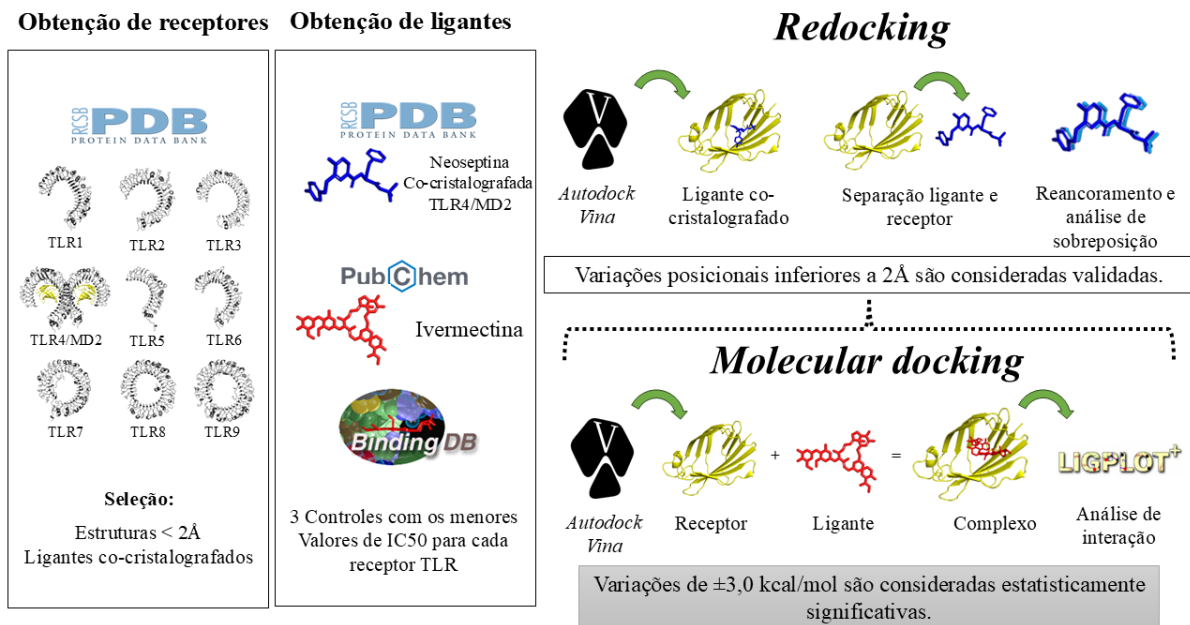
Para investigar a interação entre a ivermectina e os TLRs e, em especial, ao complexo TLR4/MD-2, foi realizada uma busca sistemática na literatura com o objetivo de identificar um modelo estrutural apropriado. A estrutura cristalográfica 5IJC do complexo humano TLR4/MD-2, disponível no *Protein Data Bank* (PDB), foi selecionada por conter o ligante co-cristalizado neoseptina com valores de IC_{50} previamente reportados, permitindo a validação do sítio de ligação. Adicionalmente, as estruturas cristalográficas dos receptores *Toll-like* humanos TLR1 a TLR9 foram obtidas a partir do PDB, utilizando os seguintes códigos PDB: TLR1/2 (2Z7X), TLR3 (1ZIW), TLR5 (3V44), TLR6 (3A7B), TLR7 (8TTY), TLR8 (7R54) e TLR9 (5Y3J). A seleção dessas estruturas baseou-se na completude estrutural e na disponibilidade de sítios de ligação relevantes para análises de interação proteína-ligante. Além disso, todas as proteínas envolvidas na via canônica de ativação do TLR-4 foram obtidas utilizando os mesmos parâmetros empregados para a estrutura do complexo TLR4/MD-2.

Para cada receptor TLR, três compostos controles foram selecionados a partir do banco de dados BindingDB, com base nos menores valores de IC_{50} reportados para cada alvo. As estruturas proteicas foram preparadas utilizando o *software* MGLTools, seguindo um protocolo padrão que incluiu a remoção de moléculas de água, adição de hidrogênios polares, atribuição de cargas de Kollman, correção de átomos ausentes e exclusão de cadeias não relevantes. A estrutura tridimensional da ivermectina foi obtida a partir do banco de dados PubChem e convertida para o formato PDBQT utilizando o *software* *OpenBabel*, com aplicação da opção “-gen3d” para otimização geométrica.

Depois de preparados os arquivos dos receptores e ligantes, realizou-se a etapa de ancoragem molecular (*molecular docking*), na qual os arquivos das proteínas-alvo foram abertos no *software* MGLTools para o processo de criação da Gridbox, em que se construiu a caixa ao redor dos ligantes co-cristalizados presentes originalmente na estrutura. Após a delimitação da região, realizou-se primeiramente o

processo de *redocking* (BARREIRO; FRAGA, 2014), no *software* AutoDock Vina, em que os ligantes co-cristalizados anteriormente separados foram novamente ancorados à proteína para a obtenção de resultados de controle. As interações proteína–ligante resultantes foram visualizadas e analisadas com o auxílio do *software* LigPlot+, com foco na identificação e comparação dos principais contatos formados entre a ivermectina e os resíduos localizados no sítio ativo das proteínas analisadas. O desenho esquemático metodológico empregado na análise *in silico* de interações proteína–ligante encontra-se na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma metodológico do acoplamento molecular *in silico* envolvendo receptores TLR, em especial do complexo TLR4/MD-2 e ivermectina.



Legenda: As estruturas cristalográficas dos TLRs foram obtidas do *Protein Data Bank* e preparadas para ancoragem molecular, enquanto a ivermectina e os ligantes controle foram selecionados a partir dos bancos PubChem e BindingDB. A validação do protocolo foi realizada por meio de *redocking* dos ligantes co-cristalizados, considerando desvios posicionais inferiores a 2 Å como aceitáveis. O *molecular docking* foi conduzido utilizando o *software* AutoDock Vina, com delimitação da região de ancoragem baseada nos sítios co-cristalizados, e as interações proteína–ligante foram analisadas com o auxílio do LigPlot+, sendo diferenças energéticas de ligação iguais ou superiores a $\pm 3,0$ kcal/mol consideradas relevantes. Fonte: o autor.

2.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Para avaliação da viabilidade celular do tratamento com ivermectina em macrófagos RAW 264.7, células da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foram submetidas a um pré-tratamento com ivermectina (ivermectina 1% Ivomec®) na concentração de 1 µg/mL em meio DMEM, permanecendo incubadas por 1 hora, conforme previamente descrito na literatura (ZHANG *et al.*, 2008). Posteriormente, foi realizado o ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após o tratamento com ivermectina, além do grupo tratado com Triton X-100 a 1% como controle negativo de viabilidade, foi adicionado à placa de 24 poços o MTT na concentração de 5 mg/mL por poço, sendo a placa incubada a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido, e foi adicionado o tampão de extração contendo DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A solução resultante foi homogeneizada, a fim de garantir a completa dissolução do corante. Para quantificação, cada amostra/poço foi lida em uma placa de 96 poços, no comprimento de onda de 550 nm, utilizando um leitor de microplacas (*Bio-Tropsch Tek Instruments, Winooski, VT, EUA*). Todo o teste foi realizado em triplicata.

2.3 Inibição do complexo TLR4/MD-2, tratamento com ivermectina e ativação de NF-κB

Células da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 estavelmente transfectadas com um gene repórter de luciferase sob controle transcricional de elementos responsivos ao fator de transcrição NF-κB foram utilizadas para a avaliação da ativação da via de sinalização do NF-κB. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, quantificadas em câmara de Neubauer, na concentração de 4×10^5 células por poço, em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e anfotericina B e 1% de HEPES, e mantidas em incubação durante a noite, em estufa a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂, a fim de permitir adequada adesão celular à superfície da placa.

Para a inibição da sinalização mediada pelo complexo TLR4/MD-2, as células aderidas foram tratadas com o antagonista específico de TLR4, LPS/RS (InvivoGen®), um lipopolissacarídeo advindo da bactéria fotossintética *Rhodobacter sphaeroides*,

que se liga especificamente ao complexo MD-2, por um período de 2 horas. Após essa etapa, o meio contendo o inibidor foi retirado, e as células foram submetidas a um pré-tratamento com ivermectina (ivermectina 1% Ivomec®), na concentração de 1 µg/mL em meio DMEM, permanecendo incubadas por 1 hora, conforme previamente descrito na literatura (ZHANG et al., 2008).

Concluído o pré-tratamento, o meio contendo ivermectina foi retirado, e as células foram estimuladas ou não com LPS, na concentração de 10 µg/mL, por um período de 4 horas, com o objetivo de induzir a ativação da via NF-κB dependente de TLR4. Ao término do período de estimulação, o sobrenadante foi coletado para posteriores análises, e os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos à lise celular por meio da adição de 50 µL de tampão de lise TNT (0,01 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20) por poço e lise mecânica, permitindo a liberação do conteúdo celular para posterior análise.

A partir de cada poço, um volume de 10 µL do lisado celular foi coletado e transferido para placas de 96 poços de fundo branco, sendo então misturado com 25 µL de reagente de luciferase contendo luciferina na concentração de 0,5 mg/mL. A leitura da luminescência foi realizada imediatamente após a adição do reagente, utilizando um leitor de microplacas. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência (*relative luminescence units* – RLU), de acordo com metodologia previamente estabelecida (SALIBA et al., 2024), e os dados foram analisados por meio de porcentagens de ativação, comparados ao grupo controle sem tratamento prévio, acrescido de LPS. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.4 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (*Bone marrow-derived macrophage* – BMDM)

Para a obtenção de BMDMs, camundongos C57BL/6 foram eutanasiados com dose letal de anestésicos, seguida de deslocamento cervical, e tiveram os fêmures e as tíbias extraídos. As epífises dos ossos foram cortadas, seguidas da injeção de cloreto de sódio 0,9% estéril por osso, até a remoção completa da medula óssea. A suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos, e o precipitado de células foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e anfotericina B e 1% de HEPES. Após, as

amostras foram submetidas à filtração em separadores de nylon com malha de 70 µm, para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula–célula.

Após a filtração, as células foram plaqueadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C por 2 horas, em atmosfera de 5% de CO₂, de maneira a obter somente células não diferenciadas. Em seguida, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e posteriormente ressuspensas em 1 mL de DMEM, alto em glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e anfotericina B e 1% de HEPES. As células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer por meio da marcação com azul de Tripán e plaqueadas na concentração de 5 × 10⁵ células por poço, a fim de se obter BMDM em placa de 24 poços, com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e anfotericina B e 1% de HEPES, mais 10% de LCCM (*L929 cell conditioned medium*) como fonte de fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF).

As placas foram incubadas a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, com adição de 100 µL de LCCM por poço no quarto dia após o plaqueamento das células, correspondente a 10% do volume total de meio por poço. No sétimo dia, o meio foi trocado por novo DMEM suplementado com 10% de LCCM, e os experimentos foram conduzidos a partir do 10º dia da derivação.

2.5 Cultivo da estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA14

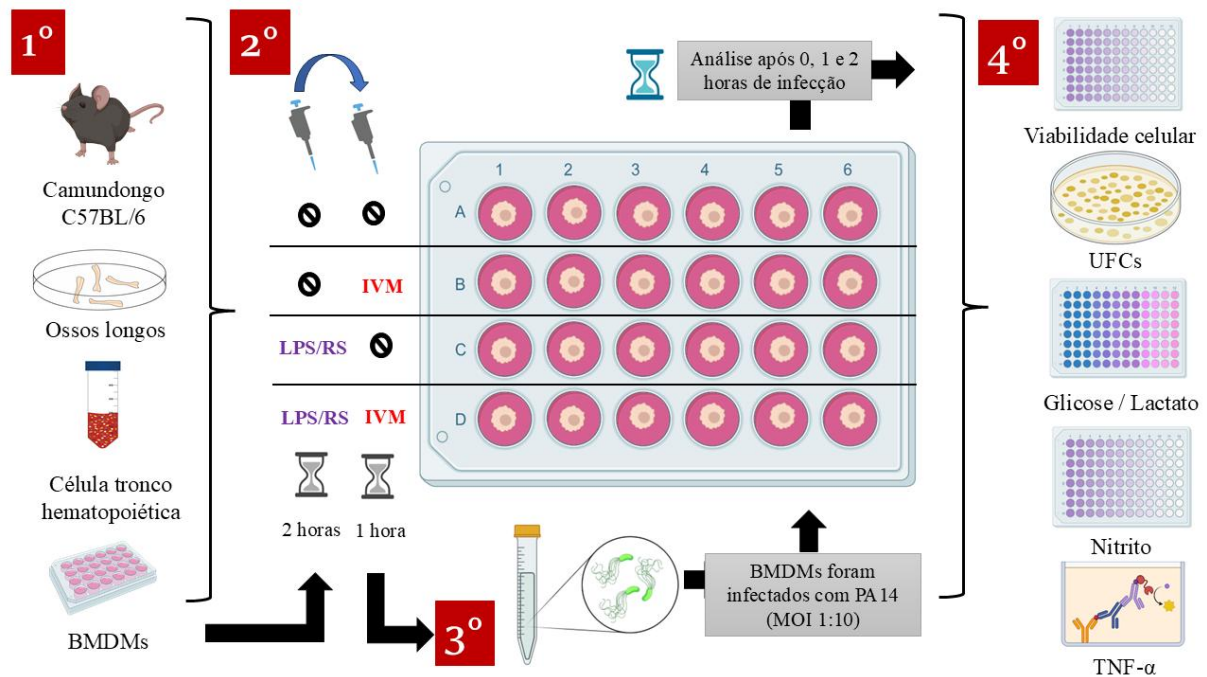
Foi utilizada a cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14, pertencente à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Microbiologia Molecular e de Microrganismos da Universidade Federal de Alfenas. A PA14 foi cultivada em caldo Lauria *Broth* (LB), à temperatura de 37 °C e a 180 rpm, até a fase de crescimento exponencial (fase *log*) e, em seguida, utilizada tanto para a infecção *in vitro* quanto para a infecção *in vivo* (ROSA *et al.*, 2020).

2.6 Inibição de TLR-4/MD2, tratamento com ivermectina e infecção com PA14 em BMDM

Após o cultivo dos BMDM, a inibição do TLR4/MD-2 e o tratamento com ivermectina deram-se conforme previamente descrito para macrófagos RAW 264.7. Após o estímulo, os sobrenadantes foram coletados para a quantificação de nitrito e avaliação metabólica por meio da dosagem de glicose e lactato, conforme descritos abaixo. Após isso, foram realizadas novas culturas de BMDM, seguidas do desafio com *P. aeruginosa*, sendo repetidas a inibição e o tratamento com ivermectina, conforme descrito, e, posteriormente, realizado o desafio com *P. aeruginosa*. A cepa PA14 foi administrada na proporção de MOI de 10.

A PA14, em fase log, foi inoculada em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de HEPES, adicionada aos macrófagos e centrifugada a 1.200 rpm por 10 minutos. Em seguida, foi permitida a fagocitose por 50 minutos, à temperatura de 37 °C e sob atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas cinco vezes com cloreto de sódio 0,9% e foi adicionado DMEM suplementado com 100 µg/mL de gentamicina por 30 minutos, para eliminação de *P. aeruginosa* extracelular. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com cloreto de sódio 0,9% e foi adicionado meio DMEM alto em glicose suplementado. Nos intervalos de 0, 1 e 2 horas, as células foram lavadas e lisadas com 0,1% de Triton X-100, seguidas de diluição seriada e plaqueamento em ágar LB, sendo incubadas a 37 °C *overnight* para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs). Da mesma forma, os sobrenadantes foram plaqueados como controle para verificação da ausência de bactérias extracelulares. Além disso, os sobrenadantes foram coletados para as demais análises. Todos os testes foram realizados em triplicata. Adicionalmente, foi realizado o ensaio de MTT para verificar se o processo infeccioso *in vitro*, a jusante do tratamento com ivermectina, interferiria na viabilidade celular (JAGER *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021; TOSSETI *et al.*, 2021; DU *et al.*, 2022). O delineamento experimental e o fluxo metodológico das abordagens descritas estão resumidos esquematicamente abaixo (Figura 4).

Figura 4 - Desenho experimental *in vitro* para avaliação da inibição do complexo TLR4/MD-2, tratamento com ivermectina e infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em macrófagos murinos.



Legenda: Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) obtidos de camundongos C57BL/6 foram submetidos à inibição do complexo TLR4/MD-2 com LPS/RS, seguida de pré-tratamento com ivermectina e posterior infecção com *P. aeruginosa* PA14 (MOI 1:10). Após os períodos experimentais estabelecidos, foram realizadas análises de viabilidade celular, contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs), dosagem de glicose e lactato, quantificação de nitrito e avaliação da produção de TNF- α , conforme indicado. As coletas foram realizadas nos tempos de 0, 1 e 2 horas após a infecção, de acordo com o fluxo metodológico representado. Fonte: o autor.

2.7 Dosagem de lactato e glicose de BMDM inibidos, estimulados e/ou infectados com PA14

O sobrenadante do meio de cultura dos BMDM, com TLR4/MD-2 inibidos ou não, estimulados ou não com ivermectina e/ou infectados com *P. aeruginosa*, foi coletado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para os testes, foram utilizados os seguintes kits específicos: Glicose Liquiform e Lactato Liquiform, Labtest (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram incubadas com os reagentes fornecidos pelos kits e mantidas por 5 minutos (lactato) ou 10 minutos (glicose) em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 550 nm (lactato) e 505 nm

(glicose) (*Bio-Tropsch Tek Instruments, Winooski, VT, EUA*). Os cálculos para determinação das concentrações foram realizados da seguinte forma: [Glicose] = (absorbância da amostra/absorbância do padrão) × 100; [Lactato] = (absorbância da amostra/absorbância do padrão) × 40. Todos os testes foram realizado em triplicata.

2.8 Camundongos e comitê de ética

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as leis brasileiras nº 6.638 e nº 9.605, referentes à experimentação animal. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (CEUA 23/2021). Os camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 e TLR4^{-/-}, com idades entre 6 e 8 semanas, foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas ou doados pela Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os camundongos foram mantidos em gaiolas isoladas, sob ciclo claro/escuro de 12:12, alimentados *ad libitum* com dieta padrão para roedores e sem restrições de acesso à água.

2.9 Tratamento com ivermectina; grupos experimentais e infecção intratraqueal com PA14

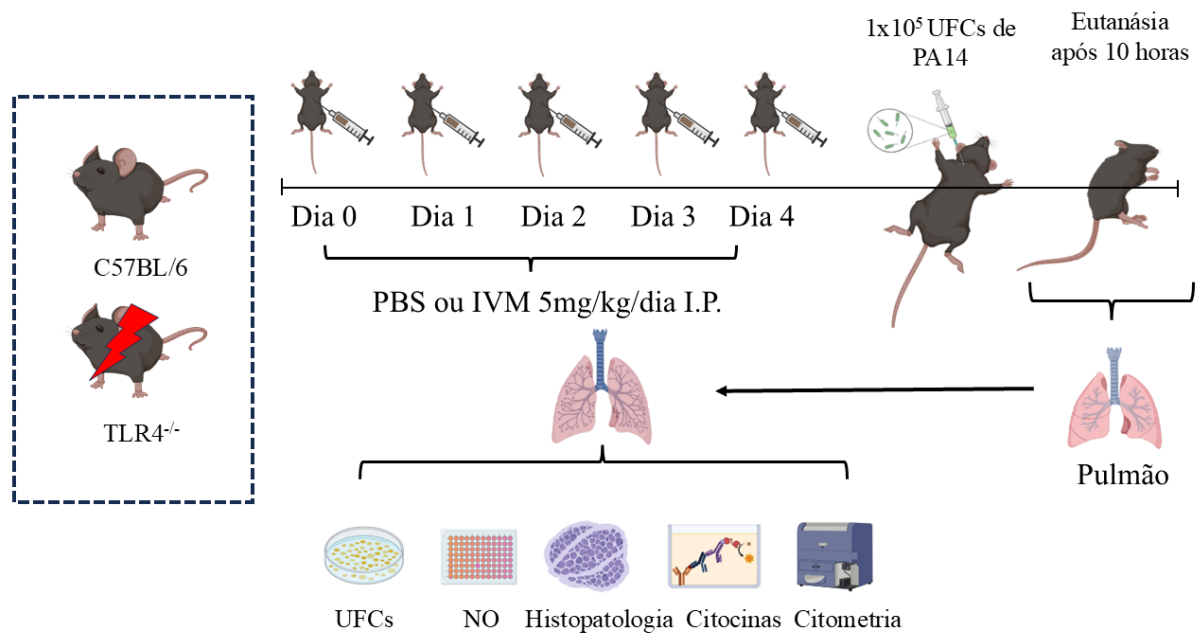
Ivermectina 1% (p/v) foi administrada por via intraperitoneal, na dose de 5 mg/kg/dia, em camundongos. Camundongos C57BL/6 ou TLR4^{-/-} foram separados aleatoriamente em oito grupos diferentes, sendo a relação de sexo macho/fêmea na mesma proporção dentro dos grupos experimentais. Os grupos PBS C57BL/6; PBS TLR4^{-/-}; PBS/I C57BL/6; PBS/I TLR4^{-/-} foram tratados por cinco dias consecutivos com solução tampão fosfato (PBS). Os grupos IVM C57BL/6; IVM TLR4^{-/-}; IVM/I C57BL/6; IVM/I TLR4^{-/-} foram tratados por cinco dias consecutivos com ivermectina; (N = 5 animais/grupo). O peso corporal e o consumo de ração foram verificados diariamente.

No último dia de tratamento, os camundongos foram infectados por via intratraqueal com a cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14, conforme descrito por Belo e colaboradores (2023). Resumidamente, os camundongos foram anestesiados com cetamina/xilazina (80/10 mg/kg, i.p.) e tiveram as traqueias expostas por meio de uma pequena incisão na pele do pescoço, sendo a infecção realizada pela instilação de 10

μL de suspensão bacteriana contendo 1×10^5 unidades formadoras de colônia (UFCs), em fase log, por animal. Após a instilação, a pele do pescoço foi suturada.

Os camundongos foram mantidos em posição vertical por 5 minutos e transferidos para uma almofada de aquecimento até a recuperação completa da anestesia. Em seguida, permaneceram sob observação constante e, após 10 horas de infecção, foram eutanasiados, sob anestesia, por deslocamento cervical, para a coleta de material biológico protocolado pelo grupo de pesquisa, conforme ilustrado no esquema experimental abaixo (Figura 5) (ROSA *et al.*, 2020; BELO *et al.*, 2021).

Figura 5 - Desenho experimental *in vivo* para avaliação do papel do complexo TLR4/MD-2 no tratamento com ivermectina durante a infecção pulmonar por *P. aeruginosa* PA14.



Legenda: Camundongos C57BL/6 ou deficientes para TLR4 ($\text{TLR4}^{-/-}$) receberam PBS ou ivermectina (5 mg/kg/dia, via intraperitoneal) por cinco dias consecutivos. No último dia de tratamento, os animais foram infectados por via intratraqueal com *P. aeruginosa* PA14 (1×10^5 UFCs/animal) e eutanasiados após 10 horas de infecção para coleta de pulmões. As amostras pulmonares foram utilizadas para determinação de carga bacteriana (UFCs), dosagem de óxido nítrico (NO), análise histopatológica e estereológica, quantificação de citocinas e avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo para os perfis Th1 e Th17. Fonte: o autor.

2.10 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Fragmentos de tecido pulmonar provenientes de animais infectados foram coletados e macerados individualmente em 9 mL de solução salina estéril, com o objetivo de obter uma suspensão homogênea. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições seriadas decimais, as quais foram semeadas em placas contendo meio ágar LB.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, em condições aeróbias. Após o período de incubação, as UFCs foram enumeradas, e os resultados expressos como o logaritmo do número de UFCs por pulmão, para cada animal por grupo experimental.

2.11 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico foi realizada pelo método de Griess. Resumidamente, os sobrenadantes das culturas de BMDM ou o homogeneizado do macerado pulmonar foram adicionados a placas de 96 poços, juntamente com a curva controle (solução de nitrito na concentração de 10 µM). Em seguida, foram adicionados 100 µL do sobrenadante e 100 µL do reagente de Griess (solução 1:1 de sulfanilamida 1% e 0,1% de dihidroclorato de naftiletlenodiamina, diluída em 5% de ácido fosfórico). Posteriormente, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 540 nm, utilizando um leitor de microplacas (*Bio-Tropsch Tek Instruments, Winooski, VT, EUA*). Todo o teste foi realizado em triplicata.

2.12 Processamento histológico pulmonar e análise histopatológica

Amostras de pulmão (lobo esquerdo) foram coletadas e fixadas por imersão em solução de formaldeído tamponado a 10% (0,1 M, pH 7,2) por 24 horas, desidratadas em etanol e diafanizadas em xilol, conforme descrito previamente (FELIZARDO *et al.*, 2018). Os fragmentos teciduais foram incluídos em parafina histológica, seccionados em cortes de 4 µm de espessura, utilizando micrótomo rotativo, corados por hematoxilina e eosina (H&E) e montados em lâminas histológicas com meio de montagem Entelan (Merck, Darmstadt, Alemanha) (SARANDY *et al.*, 2017; SARANDY *et al.*, 2018). As imagens histológicas pulmonares foram obtidas por meio de fotomicroscópio de campo claro (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Alemanha). Para cada animal, 20 campos histológicos foram adquiridos aleatoriamente, utilizando aumento total de 400× (objetiva de 40× e ocular de 10×).

A análise histopatológica foi realizada de forma qualitativa, com base na observação da histoarquitetura pulmonar típica e na identificação de alterações morfológicas clássicas, incluindo colapso ou hiperinsuflação alveolar, presença de exsudato alveolar, aumento da celularidade intersticial/infiltrado inflamatório e colapso ou congestão vascular (LACERDA *et al.*, 2009). As avaliações foram conduzidas por patologista experiente, cego em relação aos tratamentos e aos grupos experimentais. Animais saudáveis foram utilizados como referência para a normalidade microestrutural pulmonar (LACERDA *et al.*, 2009).

2.13 Análise estereológica e histomorfométrica pulmonar

A microestrutura pulmonar foi analisada quantitativamente por meio de métodos estereológicos. A densidade volumétrica (V_v , %) do septo alveolar e do espaço alveolar foi determinada utilizando a fórmula $V_v = \Sigma p/P_t$, em que Σp corresponde ao número de pontos do sistema-teste que interceptam a estrutura de interesse e P_t representa o número total de pontos do retículo estereológico ($n = 100$) (NOVAES *et al.*, 2016). A densidade numérica (N_v) de alvéolos e de células intersticiais pulmonares foi estimada de acordo com a equação $N_v = Q_a/T_a$, na qual Q_a corresponde ao número de estruturas de interesse presentes na área-teste e T_a representa a dimensão da área de teste no nível tecidual ($35 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) (NOVAES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018).

O volume médio alveolar foi estimado no pulmão por meio do método do volume estrela (V^*), conforme previamente descrito (SANTOS *et al.*, 2021). Esse parâmetro foi calculado a partir da análise aleatória de 100 alvéolos por grupo experimental, utilizando-se a equação $V^* = (\pi/3) \times \ell^3$, em que ℓ representa o comprimento médio do intercepto linear com orientação aleatória a partir de um ponto intra-alveolar. Todas as análises estereológicas e histomorfométricas foram realizadas utilizando o software Image Pro-Plus, versão 4.5 (CUPERTINO *et al.*, 2017; SARANDY *et al.*, 2017).

2.14 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Foram utilizados os sobrenadantes das culturas de células RAW 264.7, BMDM e o homogeneizado do macerado pulmonar para a análise quantitativa da secreção de citocinas, sendo elas TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-17A, por meio do *kit Murine*

Standard ABTS ELISA Development Kit, conforme descrito pelo fabricante (*PeptoTech, Cranbury, NJ, EUA*). Em suma, foi utilizada placa Nunc MaxiSorp sensibilizada com anticorpo de captura na concentração de 1 µg/mL, incubada *overnight*, seguida de quatro lavagens com solução de PBS contendo 0,05% de Tween-20. Em seguida, foi adicionado tampão de bloqueio contendo 1% de BSA em PBS, sendo a placa incubada por 1 hora, seguida de quatro lavagens.

Posteriormente, foram adicionados os padrões (TNF-α, 2.000 pg/mL; IL-6, 4.000 pg/mL; IL-10, 1.000 pg/mL; IFN-γ, 1.000 pg/mL; IL-17A, 1.000 pg/mL, diluídos serialmente) e as amostras, com incubação por 2 horas, seguida de lavagem. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de detecção (1 µg/mL), com incubação por 2 horas, seguida de lavagem e adição do conjugado avidina-HRP na diluição 1:200, incubado por 30 minutos, com posterior lavagem. Por fim, foi adicionado o substrato ABTS, incubado à temperatura ambiente até o desenvolvimento de cor, sendo então realizada a leitura em espectrofotômetro, com densidade óptica de 405 nm e correção em 650 nm, utilizando leitor de microplacas (*Bio-Tropsch Tek Instruments, Winooski, VT, EUA*). Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.15 Análise da marcação CD4/IL17A e CD4/IFNγ por citometria de fluxo

O macerado pulmonar dos animais não tratados e tratados com ivermectina e infectados (PBS/I C57BL/6; PBS/I TLR4^{-/-}; IVM/I C57BL/6; IVM/I TLR4^{-/-}) foi tratado com tampão ACK (0,15 M NH₄Cl, 1,0 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2) para lise de hemácias. Logo após, as células foram lavadas com solução salina (NaCl 0,8%, peso/volume) e suspensas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e anfotericina B e 1% de HEPES. As amostras foram submetidas à filtração em separadores de nylon com malha de 70 µm, para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula–célula.

Após a obtenção da suspensão celular, as células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer por meio da marcação com azul de tripan e ajustadas para a densidade de 2 × 10⁵ células por poço, em placas de fundo em U. As células foram mantidas em suspensão e submetidas à etapa de bloqueio de receptores Fc por incubação com anti-CD16/CD32 (*FcBlock; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA*) por 30 minutos, a fim de minimizar ligações inespecíficas de anticorpos mediadas por

receptores Fc, seguida de centrifugação a 1.500 rpm, a 4 °C, por 5 minutos, com 300 µL de PBS.

Para a identificação das subpopulações de linfócitos T auxiliares Th1 e Th17, as células foram inicialmente coradas para o marcador de superfície CD4, utilizando anticorpo anti-CD4 conjugado a FITC (BD *Biosciences*), na concentração de 0,5 µL por poço. Em seguida, realizou-se a marcação intracelular de citocinas, empregando anticorpos anti-IFN-γ conjugado a PE para identificação de células Th1 ou anti-IL-17 conjugado a PE para identificação de células Th17 (BD *Biosciences*), na concentração de 0,5 µL por poço.

A coloração intracelular foi realizada após permeabilização celular com tampão BD FACS™ *Permeabilization Buffer* 1X, conforme as recomendações do fabricante, seguida de incubação por 30 minutos com os respectivos anticorpos. A placa foi incubada em câmara escura, a 4 °C, por 30 minutos. Após as etapas de lavagem em PBS 1X, as amostras foram submetidas à aquisição de fluorescência em citômetro de fluxo FACS Lyric™ (BD *Biosciences*, San Jose, CA, EUA).

Para cada amostra, foram adquiridos 30.000 eventos, os quais foram analisados utilizando o software FlowJo (BD *Biosciences*, San Jose, CA, EUA). As populações celulares foram comparadas com amostras provenientes de animais não infectados, tratados apenas com PBS, utilizados como controles biológicos. Células não coradas foram empregadas como controles negativos para a definição dos parâmetros de *gate* e exclusão de autofluorescência, conforme previamente descrito (CEBINELLI *et al.*, 2021).

2.16 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados com, no mínimo, duas repetições independentes, a fim de assegurar a reprodutibilidade dos resultados, tendo sido observada consistência entre as réplicas experimentais. A organização, a visualização dos dados e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism®, versão 8.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de D'Agostino–Pearson. Nos casos em que o tamanho amostral foi reduzido, a normalidade foi verificada utilizando-se o teste de Shapiro–Wilk, conforme recomendação para pequenos conjuntos de dados.

Para dados com distribuição paramétrica, as comparações entre dois grupos independentes foram realizadas por meio do teste t de *Student* não pareado. Quando mais de dois grupos foram comparados, empregou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste pós-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Para dados que não apresentaram distribuição normal, as comparações entre dois grupos foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann–Whitney. Quando apropriado, comparações entre mais de dois grupos foram conduzidas por meio do teste de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3.0 RESULTADOS

3.1 A ivermectina liga-se ao correceptor MD-2 do TLR4 com alta afinidade e a todos os TLRs com intensidade semelhante

Os resultados apresentados neste tópico contextualizam a etapa inicial do estudo, na qual foi investigada, por meio de análises *in silico*, a interação da ivermectina com receptores da imunidade inata, com ênfase no complexo TLR4/MD-2, estrutura central no reconhecimento do LPS por macrófagos. Inicialmente, o protocolo de ancoragem molecular (*molecular docking*) foi validado por meio do *redocking* do ligante co-cristalizado neoseptina na estrutura do complexo TLR4/MD-2 (PDB: 5IJC). Essa validação resultou em um valor de RMSD de 0,28 Å entre a conformação “redockada” e a estrutura cristalográfica original, valor inferior ao limite de 2,0 Å, confirmando a precisão e a confiabilidade do método utilizado para a avaliação das interações moleculares. A neoseptina foi utilizada como ligante de referência por ser o único composto co-cristalizado com o MD-2 entre as estruturas analisadas. Após a validação do protocolo, a ivermectina foi submetida à ancoragem molecular com diferentes TLRs e com o correceptor MD-2, sendo os resultados comparados a compostos controle específicos, conforme descritos na Tabela 1, para cada receptor, previamente identificados na base de dados BindingDB.

Tabela 1 - Identificação dos compostos controle utilizados nas análises de *docking* molecular para cada receptor TLR e para o correceptor MD-2.

| | Controle 1 | Controle 2 | Controle 3 |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|
| TLR1 | BDBM50552135 | BDBM50543142 | BDBM50463543 |
| TLR2 | BDBM315416 | BDBM50570375 | BDBM50590252 |
| TLR3 | BDBM50543466 | BDBM50563780 | BDBM21958 |
| TLR4 | BDBM50274760 | BDBM50177125 | BDBM50595028 |
| MD-2 | Neoseptina* | BDBM50271262 | BDBM50580156 |
| TLR5 | BDBM50552136 | BDBM50563780 | BDBM50543142 |
| TLR6 | BDBM50399456 | BDBM50589247 | BDBM50589254 |
| TLR7 | BDBM516908 | BDBM50586260 | BDBM273647 |
| TLR8 | BDBM50586261 | BDBM428547 | BDBM428472 |

TLR9 BDBM50033123 BDBM50033101 BDBM50587873

Legenda: Os códigos apresentados correspondem aos identificadores dos ligantes selecionados a partir do banco de dados BindingDB, escolhidos com base nos menores valores de IC₅₀ reportados para cada alvo. A neoseptina* foi utilizada exclusivamente na etapa de *redocking* do complexo TLR4/MD-2 por se tratar do único ligante co-cristalizado disponível para essa estrutura (PDB: 5IJC). Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Observou-se que a ivermectina apresentou uma energia de ligação de -14,2 kcal/mol com o MD-2, valor que demonstra uma energia de ligação superior à observada para a neoseptina (-9,1 kcal/mol) e para os demais compostos controle avaliados. Considerando a variação padrão do *AutoDock Vina* ($\pm 3,0$ kcal/mol), essa diferença é relevante e indica uma interação de alta afinidade entre a ivermectina e o MD-2. Embora a ivermectina também tenha apresentado energias de ligação semelhantes às dos compostos controle para os TLRs analisados, apenas a interação com o MD-2 exibiu diferença estatisticamente relevante, reforçando a especificidade funcional dessa interação, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Energias de ligação (kcal/mol) obtidas por *docking* molecular entre a ivermectina, compostos controle e os receptores *Toll-like* (TLR1–TLR9) e o correceptor MD-2.

| | Ivermectina | Controle 1 | Controle 2 | Controle 3 |
|-------------|---------------------|------------|------------|------------|
| TLR1 | <u>-6,5</u> | -6,1 | -5,9 | -5,0 |
| TLR2 | <u>-6,4</u> | -3,8 | -4,7 | -5,8 |
| TLR3 | <u>-7,2</u> | -7,2 | -6,8 | -5,5 |
| TLR4 | <u>-7,5</u> | -5,4 | -6,6 | -5,5 |
| MD-2 | <u>-14,2</u> | -9,1 | -7,2 | -7,9 |
| TLR5 | <u>-7,2</u> | -7,9 | -7,0 | -8,2 |
| TLR6 | <u>-7,9</u> | -3,9 | -4,3 | -5,2 |
| TLR7 | <u>-7,7</u> | -7,5 | -7,4 | -7,3 |
| TLR8 | <u>-8,8</u> | -7,1 | -7,4 | -8,5 |
| TLR9 | <u>-8,3</u> | -7,5 | -7,0 | -7,4 |

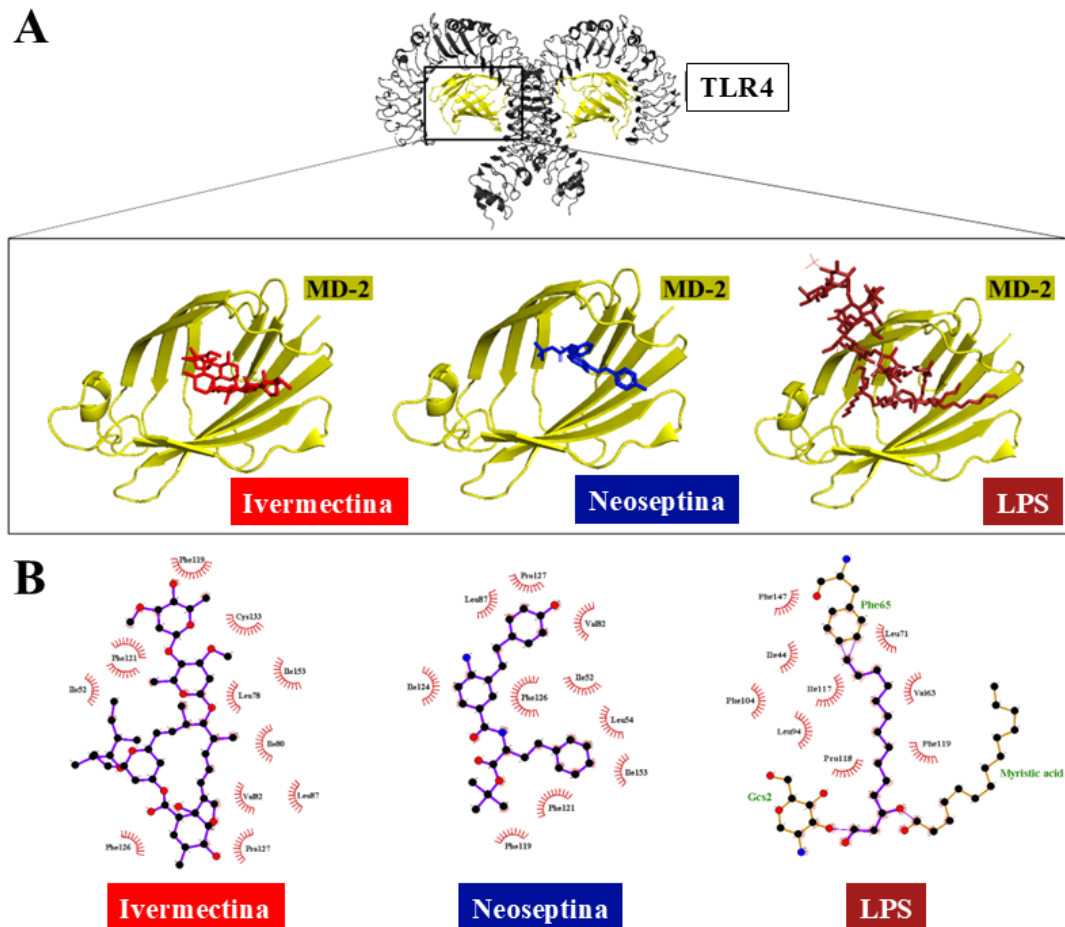
Legenda: Os valores representam as afinidades previstas pelo *AutoDock Vina* para cada complexo proteína–ligante. Diferenças iguais ou superiores a $\pm 3,0$ kcal/mol foram

consideradas relevantes. Observa-se que a ivermectina apresentou maior afinidade pelo MD-2 em comparação aos compostos controle, enquanto para os demais TLRs as energias de ligação foram semelhantes às dos respectivos controles. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

A representação tridimensional demonstra que a ivermectina se liga ao sítio ativo do MD-2 de maneira semelhante à neoseptina e ao LPS, que apresenta energia de ligação de $-6,9$ kcal/mol, ambos ligantes clássicos do complexo TLR4/MD-2, sendo o LPS o ativador canônico da via TLR4/MD-2 e a neoseptina um agonista sintético de TLR4, sugerindo que a ivermectina ocupa uma região crítica para a modulação da ativação do receptor (Figura 6A).

A análise detalhada das interações moleculares em duas dimensões revelou que a ivermectina estabelece um total de 11 interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos do sítio ativo do MD-2, enquanto a neoseptina e o LPS estabelecem, respectivamente, 10 e 9 interações hidrofóbicas. Esse maior número de contatos hidrofóbicos sugere maior estabilidade do complexo ivermectina–MD-2 e fornece suporte estrutural para a elevada afinidade observada nos cálculos de energia de ligação (Figura 6B).

Figura 6 - Representação estrutural das interações entre a ivermectina e o complexo TLR4/MD-2 obtidas por ancoragem molecular.



Legenda: A) Representação tridimensional do receptor TLR4 associado ao correceptor MD-2 (em amarelo), evidenciando o posicionamento da ivermectina (vermelho) no sítio ativo do MD-2 em comparação com a neoseptina (azul) e o lipopolissacarídeo (LPS, marrom), ligantes clássicos do complexo TLR4/MD-2. Observa-se que os três compostos ocupam regiões sobrepostas do sítio de ligação do MD-2.

B) Diagramas bidimensionais das interações proteína–ligante no sítio ativo do MD-2, destacando os resíduos de aminoácidos envolvidos predominantemente em interações hidrofóbicas (cílios vermelhos) entre os ligantes e o correceptor. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Adicionalmente, foram avaliadas possíveis interações da ivermectina com componentes intracelulares da via de sinalização canônica do NF- κ B, incluindo TIRAP, TRIF, RIPK1, TAK1/TAB e IKK β , cujos resultados estão descritos na Tabela 3. As proteínas RIPK1 e TAK1/TAB apresentam ligantes co-cristalizados com valores de IC₅₀ disponíveis, o que as torna adequadas como controles experimentais. Em contraste, proteínas como TIRAP, TRIF e IKK β também possuem compostos co-

cristalizados em suas estruturas, porém não apresentam dados de inibição associados (por exemplo, valores de IC_{50}) no PDB. Ainda assim, essas proteínas foram incluídas na análise. Por outro lado, proteínas como TIRAP-TRAM, TRIF, TRAF6, IKKG, IKKA e inibidor alfa do NF- κ B possuem estruturas cristalográficas disponíveis, mas não apresentam ligantes co-cristalizados. Na ausência de um ligante conhecido associado à proteína, não há referência experimental para comparação ou utilização como controle. Adicionalmente, a proteína MyD88 ainda não possui uma estrutura cristalográfica completa depositada.

De acordo com a Tabela 3, a ivermectina apresentou menor energia de ligação em comparação com o composto controle para as proteínas TRIF, RIPK1, TAK1/TAB e IKK β . Notavelmente, para TRIF e TAK1/TAB, a diferença na energia de ligação excedeu o limite do desvio-padrão de $\pm 3,0$ kcal/mol, sugerindo que a ivermectina se liga de forma menos eficiente do que o controle. Para as demais proteínas, embora a ivermectina tenha apresentado energia de ligação ligeiramente menor, os valores permaneceram dentro da faixa do desvio-padrão, indicando afinidades de ligação estatisticamente comparáveis. De modo geral, a ivermectina apresentou energias de ligação menos favoráveis quando comparadas às dos respectivos compostos controle para cada proteína, apesar de formar interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio com esses alvos. Esses achados indicam que os efeitos da ivermectina sobre a ativação dessa via não decorrem de uma interação direta e dominante com proteínas intracelulares, mas possivelmente de eventos iniciados no nível do complexo TLR4/MD-2.

Tabela 3 - Resultados das análises de ancoragem molecular entre a ivermectina, compostos controle e proteínas intracelulares da via canônica de sinalização do NF- κ B.

| Receptor | PDB código | RMSD (Å) | Compostos | Energia de ligação (Kcal /Mol) | Interações hidrofóbicas | Pontes de hidrogênios | Pontes de halogênios |
|----------|------------|----------|-------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| TIRAP | 3UB2 | 1,58 | Controle | -3,2 | 0 | 2 | 0 |
| | | | Ivermectina | -5,4 | 3 | 1 | 0 |
| TRIF | 6BFN | 0,14 | Controle | -10,6 | 11 | 1 | 0 |
| | | | Ivermectina | -6,5 | 5 | 2 | 0 |
| RIPK1 | 4ITJ | 0,09 | Controle | -10,2 | 7 | 1 | 1 |

| | | | | | | | |
|--------------|------|------|-------------|-------|---|---|---|
| | | | Ivermectina | -7,8 | 5 | 2 | 0 |
| TAK1/ TAB | 5JGA | 0,62 | Controle | -11,2 | 5 | 3 | 0 |
| | | | Ivermectina | -7,4 | 4 | 3 | 0 |
| IKK β | 4KIK | 0,00 | Controle | -10,9 | 8 | 1 | 0 |
| | | | Ivermectina | -9,2 | 9 | 4 | 0 |

Legenda: São apresentados, para cada proteína avaliada (TIRAP, TRIF, RIPK1, TAK1/TAB e IKK β), o código PDB utilizado, os valores de RMSD obtidos na validação estrutural, as energias de ligação estimadas (kcal/mol) e o número de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e halogênio observadas nos complexos formados. Os compostos controle correspondem aos ligantes co-cristalizados disponíveis nas respectivas estruturas. Diferenças de energia de ligação iguais ou superiores a $\pm 3,0$ kcal/mol são relevantes para a comparação entre ivermectina e os ligantes de referência. Adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Em conjunto, os dados apresentados na Figura 1 e nas Tabelas 1 e 2 demonstram que a ivermectina se liga preferencialmente ao correceptor MD-2, ocupando o mesmo sítio funcional de ligantes clássicos do complexo TLR4/MD-2 e apresentando afinidade superior à de compostos controle.

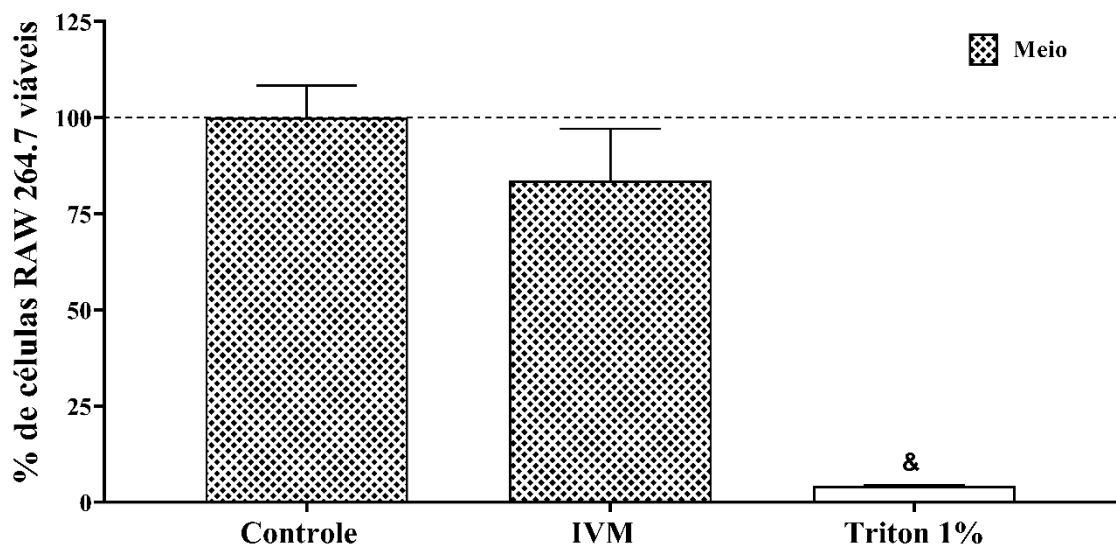
3.2 A ivermectina amplifica a ativação do NF- κ B em macrófagos, mas reduz a secreção de TNF- α , com reversão desse efeito pela inibição do complexo TLR4/MD-2

Após a verificação *in silico* da interação da ivermectina com o correceptor MD-2 do complexo TLR4/MD-2, a etapa subsequente do estudo consistiu em avaliar se essa interação se traduziria em alterações funcionais na ativação da via inflamatória dependente do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos. Para esse fim, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7 transfectados com um gene repórter de luciferase sob controle transcricional de elementos responsivos ao NF- κ B. Nessa linhagem, quando ativado, o NF- κ B induz a transcrição do gene da luciferase, cuja enzima expressa catalisa a reação responsável pela emissão de luminescência na presença de seu substrato, a luciferina, adicionada de forma exógena.

Previamente aos ensaios de sinalização, procedeu-se à avaliação da viabilidade celular, uma vez que possíveis efeitos citotóxicos poderiam interferir na interpretação dos resultados. A análise por meio do ensaio de MTT demonstrou que o

tratamento das células RAW 264.7 com ivermectina na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não promoveu redução significativa da viabilidade celular em comparação ao grupo controle, conforme previamente descrito na literatura (ZHANG *et al.*, 2008). Esses achados confirmam que a concentração empregada é não citotóxica e adequada para utilização experimental, afastando a possibilidade de que os efeitos observados sobre a via do NF- κB decorram de toxicidade celular (Figura 7).

Figura 7 - Avaliação da viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 após tratamento com ivermectina.



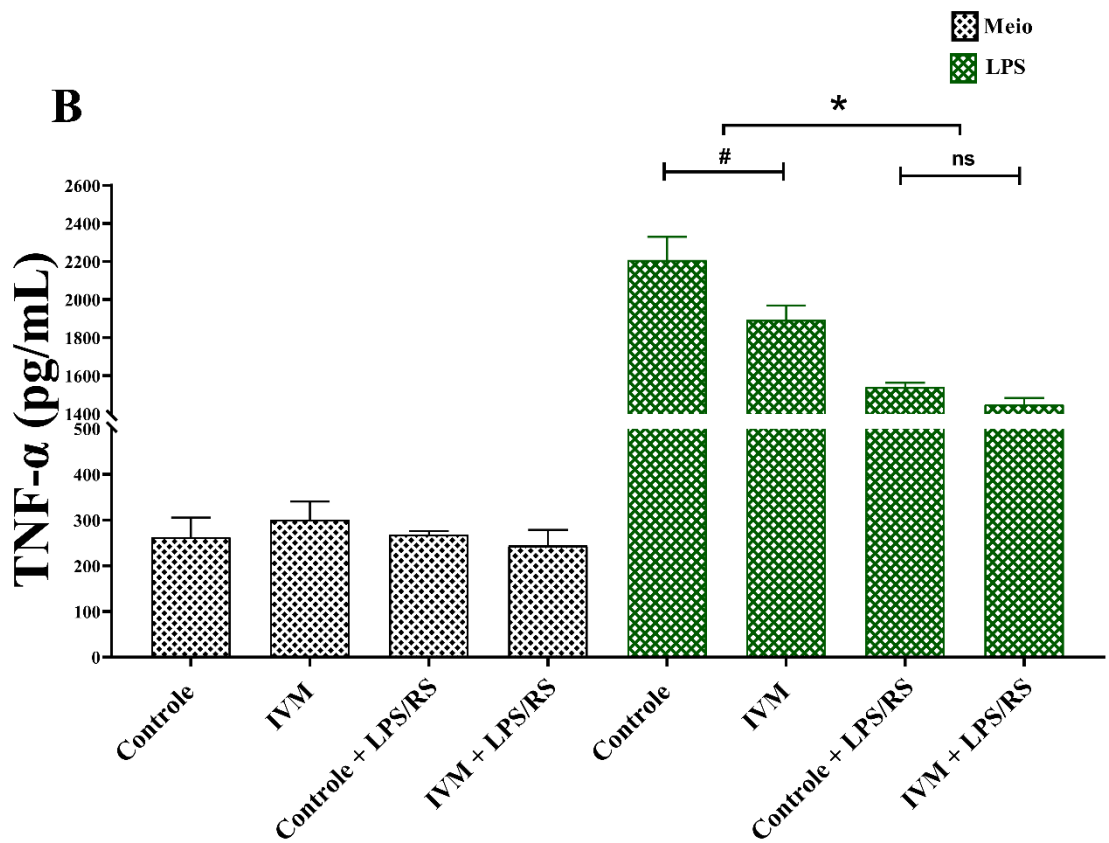
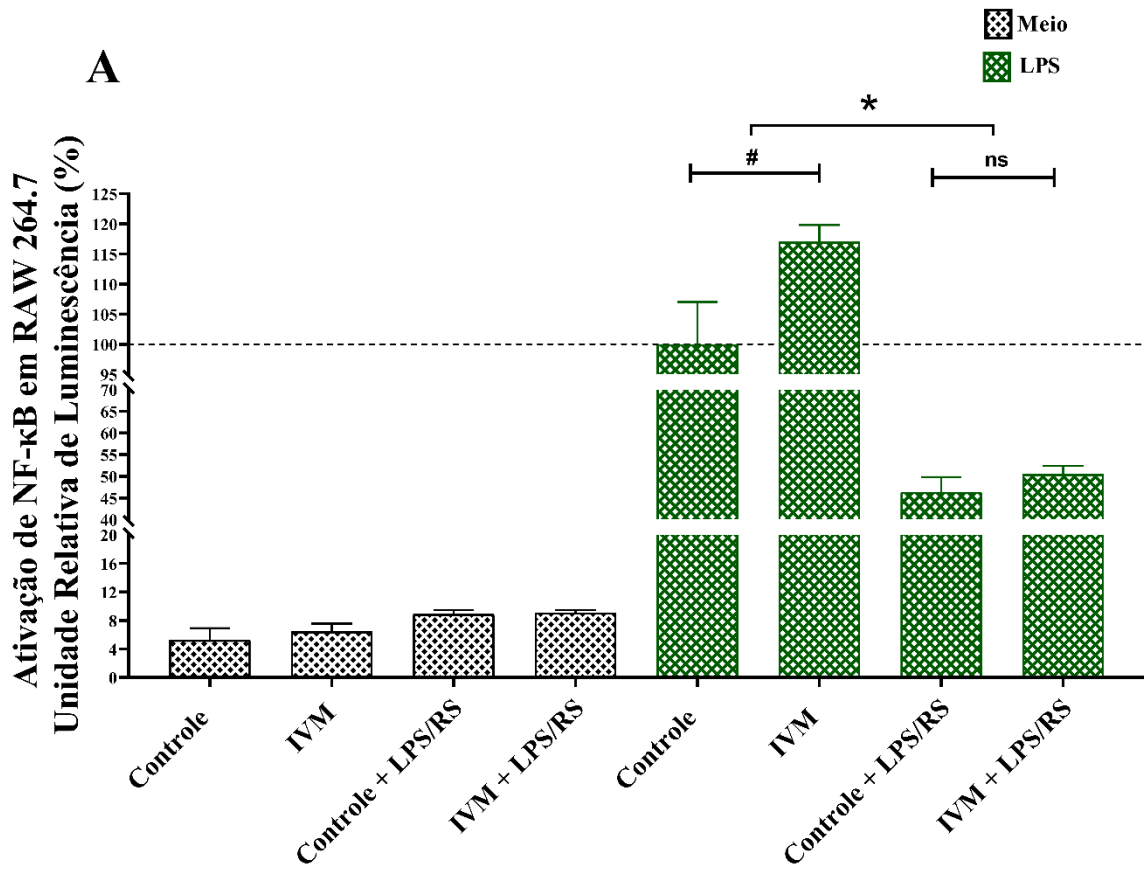
Legenda: Células RAW 264.7 foram tratadas com ivermectina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Os resultados são expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (meio). & comparado ao grupo Controle e IVM. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão de amostras em triplicata (N = 3 poços/grupo). Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Após a confirmação da viabilidade celular, foi avaliada a ativação da via do NF- κB . O tratamento com ivermectina, isoladamente, não induziu a ativação do NF- κB , conforme evidenciado pela ausência de aumento significativo na atividade de luminescência relacionada à presença da luciferase. De forma consistente, a ivermectina administrada isoladamente também não aumentou a secreção de TNF- α , indicando que, na ausência de estímulo canônico com LPS, a ivermectina não atua como agonista direto da via pró-inflamatória mediada por NF- κB , independentemente da presença ou não de inibição do complexo TLR4/MD-2 por LPS/RS (Figura 8A, B).

Em contraste, macrófagos RAW 264.7 pré-tratados com ivermectina e posteriormente estimulados com LPS apresentaram aumento significativo na ativação do NF- κ B quando comparados às células estimuladas apenas com LPS. Esse efeito foi completamente revertido pela inibição do complexo TLR4/MD-2 com LPS/RS, diminuindo os níveis de ativação do NF- κ B a valores semelhantes ao observado no grupo não tratado com ivermectina. Esses resultados demonstram que a amplificação da ativação do NF- κ B induzida pela ivermectina é dependente da integridade funcional do complexo TLR4/MD-2 (Figura 8A).

Paralelamente, a secreção de TNF- α foi avaliada nas mesmas condições experimentais. O tratamento com ivermectina, isoladamente, não alterou os níveis basais de TNF- α . No entanto, apesar do aumento da ativação do NF- κ B, os macrófagos pré-tratados com ivermectina e estimulados com LPS apresentaram redução significativa na secreção de TNF- α em comparação às células estimuladas apenas com LPS. Assim como observado para a ativação do NF- κ B, a inibição do complexo TLR4/MD-2 foi capaz de reverter esse efeito, restabelecendo os níveis de TNF- α a valores semelhantes ao controle sem tratamento com ivermectina e inibidos com LPS/RS. Esses dados indicam que, embora a ivermectina potencialize a ativação do NF- κ B na presença de LPS, essa ativação não se reflete em um aumento na produção de TNF- α , sugerindo uma dissociação entre a ativação do fator de transcrição e a indução de respostas pró-inflamatórias clássicas (Figura 8B).

Figura 8 – Efeito da ivermectina sobre a ativação da via do NF- κ B e a secreção de TNF- α em macrófagos RAW 264.7.



Legenda: A) Ativação do NF- κ B avaliada por ensaio de luciferase em macrófagos RAW 264.7 pré-tratados com ivermectina e subsequentemente estimulados com LPS, expressa em porcentagem como unidades relativas de luminescência (RLU).

B) Quantificação da secreção de TNF- α (pg/mL) nos sobrenadantes celulares obtidos nas mesmas condições experimentais.

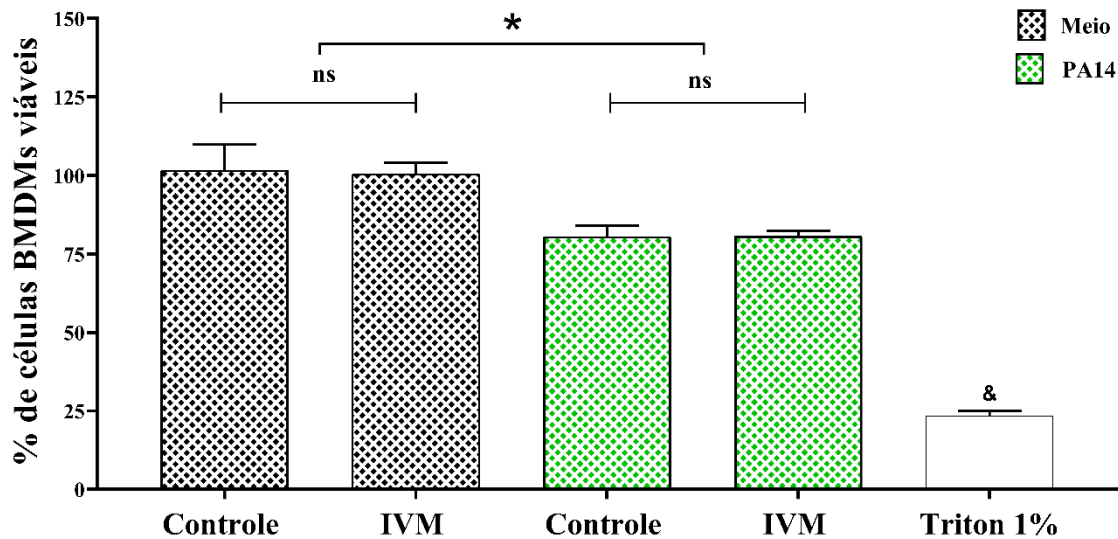
Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p \leq 0,05$. #Comparação entre os controles com macrófagos tratados com ivermectina e desafiados com LPS. *Comparação de macrófagos tratados ou não com ivermectina e desafiados com LPS, com ou sem inibição do complexo TLR4/MD-2. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de amostras em triplicata ($n = 3$ poços/grupo), representativas de três experimentos independentes. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Em conjunto, esses resultados demonstram que a ivermectina, em concentrações não citotóxicas, não ativa diretamente a via do NF- κ B em macrófagos RAW 264.7, mas amplifica sua ativação na presença de LPS, de maneira dependente do complexo TLR4/MD-2. Contudo, essa amplificação ocorre de forma dissociada da secreção de TNF- α , evidenciando um efeito modulatório seletivo da ivermectina sobre a via do NF- κ B e estabelecendo uma correlação entre os achados *in silico* de interação da ivermectina com o MD-2 e os efeitos observados em macrófagos RAW 264.7.

3.3 A ivermectina prejudica a secreção de NO e TNF- α e a eliminação de *P. aeruginosa* em BMDM, com reversão do efeito após a inibição do complexo TLR4/MD-2

Dado que a ivermectina aumentou a ativação do NF- κ B na presença de LPS, o agonista canônico do complexo TLR4/MD-2, BMDMs de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com ivermectina, na concentração de 1 μ g/mL, e então infectados com *P. aeruginosa* (PA14). Em BMDM, o tratamento com ivermectina não alterou a viabilidade celular, tanto antes quanto após a infecção por PA14 (MOI 1:10). Como esperado para um modelo *in vitro* de infecção aguda, a exposição à bactéria reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 20%; contudo, essa redução foi semelhante entre os grupos tratados e não tratados com ivermectina, indicando que a ivermectina não exerceu efeito citotóxico adicional sobre os macrófagos durante a infecção (Figura 9).

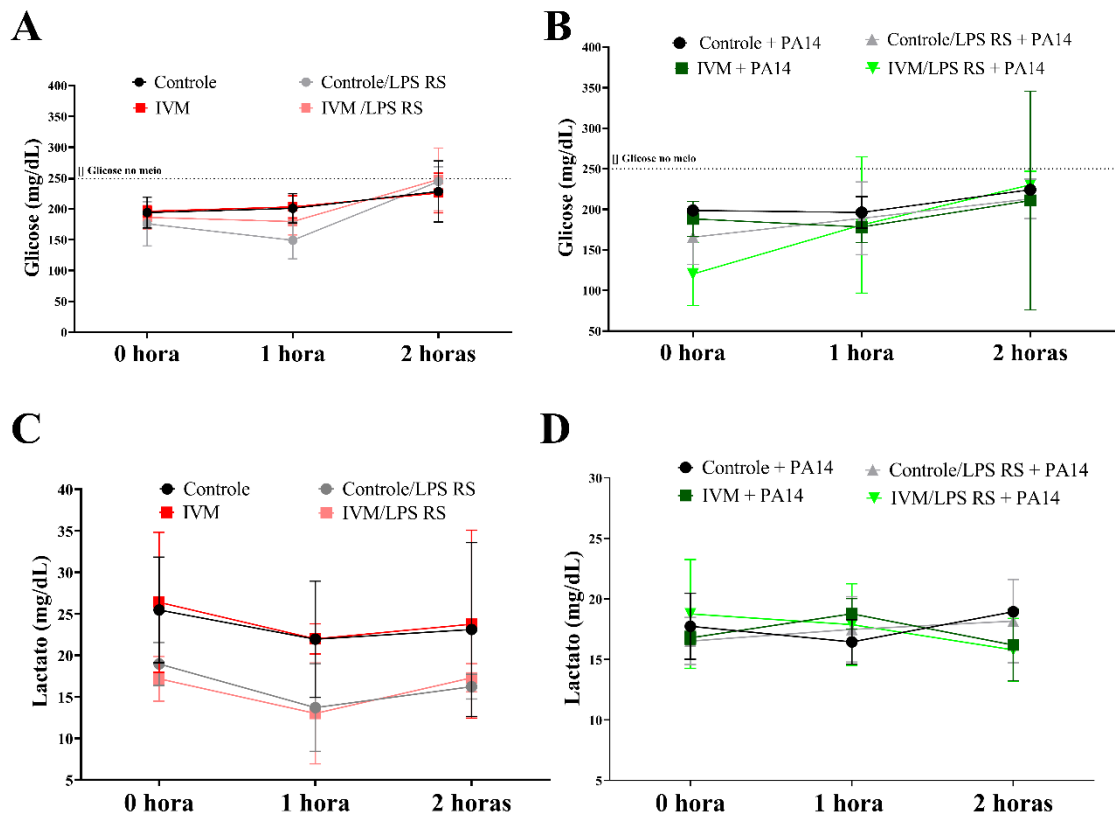
Figura 9 – Viabilidade de BMDM tratados e infectados com PA14.



Legenda: Viabilidade de BMDM de camundongos C57BL/6 tratados ou não com 1 µg/mL de ivermectina e infectados com PA14 (MOI 1:10), avaliada por ensaio de MTT. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p \leq 0,05$. *Comparação entre macrófagos infectados ou não com PA14 independente do tratamento. &Comparação entre o controle negativo com os demais grupos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de amostras em triplicata ($n = 3$ poços/grupo), representativas de três experimentos independentes. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Da mesma forma, a ivermectina não promoveu alterações metabólicas detectáveis nos BMDM, tanto na ausência quanto na presença da infecção por PA14. O consumo de glicose e a secreção de lactato permaneceram semelhantes ao longo de 0, 1 e 2 horas após a infecção, independentemente do tratamento com ivermectina ou da inibição do complexo TLR4/MD-2, e em células infectadas ou não com PA14 (Figuras 10A–D). Esses resultados indicam que a ivermectina não induziu reprogramação metabólica mensurável nessas células, nem na presença nem na ausência de infecção bacteriana, nas condições experimentais testadas.

Figura 10 – Consumo de glicose e secreção de lactato por BMDM tratados com ivermectina e infectados com PA14.



Legenda: Consumo de glicose e secreção de lactato por BMDM, com TLR4/MD-2 inibidos ou não, tratados ou não com ivermectina e infectados ou não com PA14.

A) Consumo de glicose por BMDM sem infecção.

B) Consumo de glicose por BMDM com infecção.

C) Secreção de lactato por BMDM sem infecção.

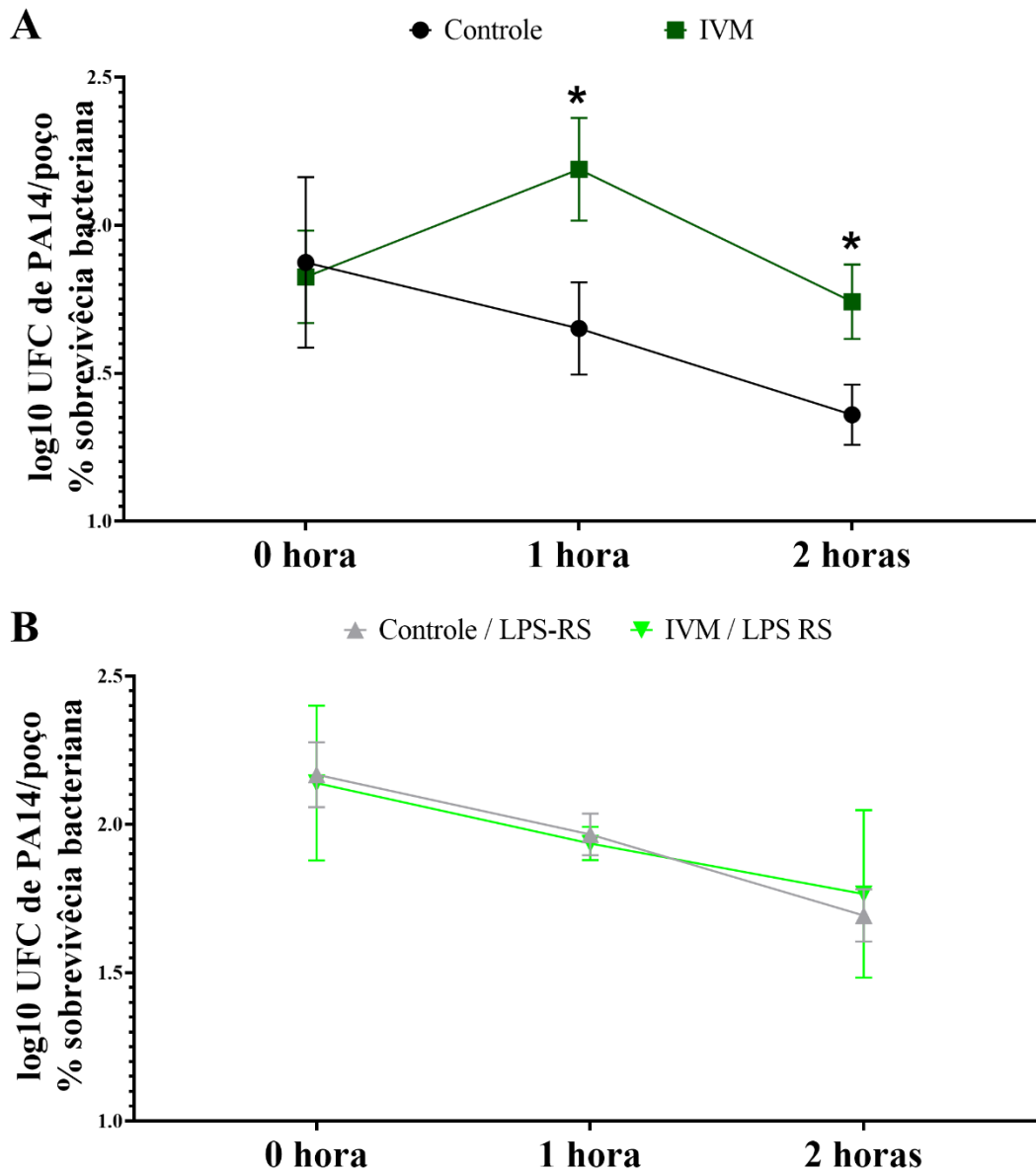
D) Secreção de lactato por BMDM com infecção.

As análises foram realizadas em 0, 1 e 2 horas após a presença ou ausência de PA14. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de amostras em triplicata ($n = 3$ poços/grupo), representativas de três experimentos independentes. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Em contraste, a função microbicida dos macrófagos foi claramente afetada. O tratamento com ivermectina prejudicou a depuração intracelular de PA14, como evidenciado pela maior recuperação de bactérias viáveis no interior dos BMDM após 1 e 2 horas de infecção, em comparação com os macrófagos não tratados (Figura 11A). Esse efeito foi revertido quando o complexo TLR4/MD-2 foi inibido com LPS/RS, restabelecendo a capacidade de eliminação bacteriana a níveis semelhantes aos

controles (Figura 11B), o que indica que o efeito da ivermectina sobre a depuração bacteriana depende funcionalmente da sinalização via TLR4/MD-2.

Figura 11 – A ivermectina prejudica a eliminação de PA14 por macrófagos tratados, sendo este efeito revertido pela inibição de TLR4/MD-2.



Legenda: Depuração intracelular de PA14 por BMDM tratados ou não com ivermectina.

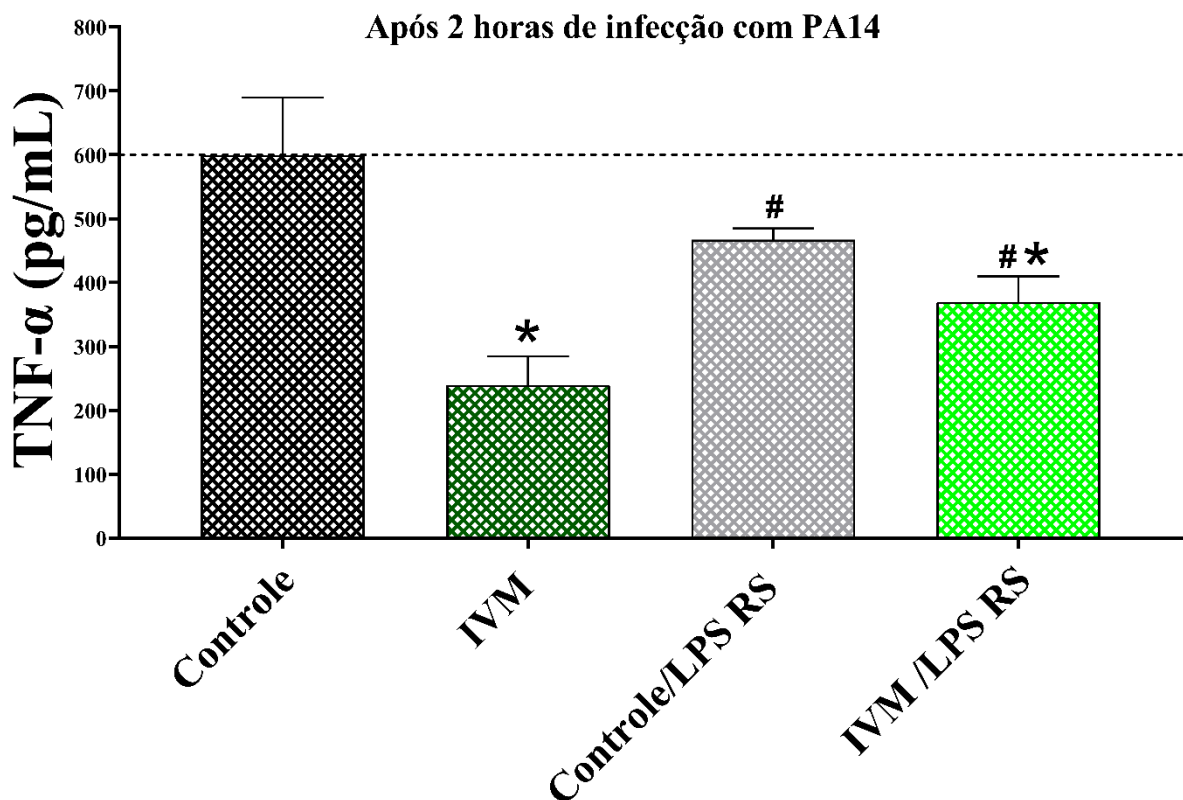
A) Recuperação de bactérias viáveis em BMDM infectados na ausência de inibição do complexo TLR4/MD-2.

B) Recuperação de bactérias viáveis em BMDM infectados após inibição do complexo TLR4/MD-2 com LPS/RS. Os dados são expressos como log₁₀ UFC de PA14 por poço, avaliados em 0, 1 e 2 horas após a infecção, sendo apresentados como média ± desvio padrão

de amostras em triplicata ($n = 3$ poços/grupo), representativas de três experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p \leq 0,05$. *Comparação entre o grupo tratado ou não com ivermectina dentro do mesmo horário. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

De forma semelhante, a secreção de TNF- α pelos BMDM infectados também foi reduzida pela ivermectina. Após 2 horas de infecção por PA14, a ivermectina diminuiu a produção de TNF- α em aproximadamente 60%, enquanto a inibição do complexo TLR4/MD-2 reduziu a secreção dessa citocina em cerca de 20,8% (Figura 12). Esses dados evidenciam que a ivermectina exerce um efeito supressor mais pronunciado sobre o TNF- α do que o bloqueio direto do receptor, reforçando seu papel modulador da resposta inflamatória mediada pela sinalização via TLR4.

Figura 12 – A secreção de TNF- α por BMDM é prejudicada com o tratamento de ivermectina, sendo este efeito parcialmente revertido pela inibição de TLR4/MD-2.

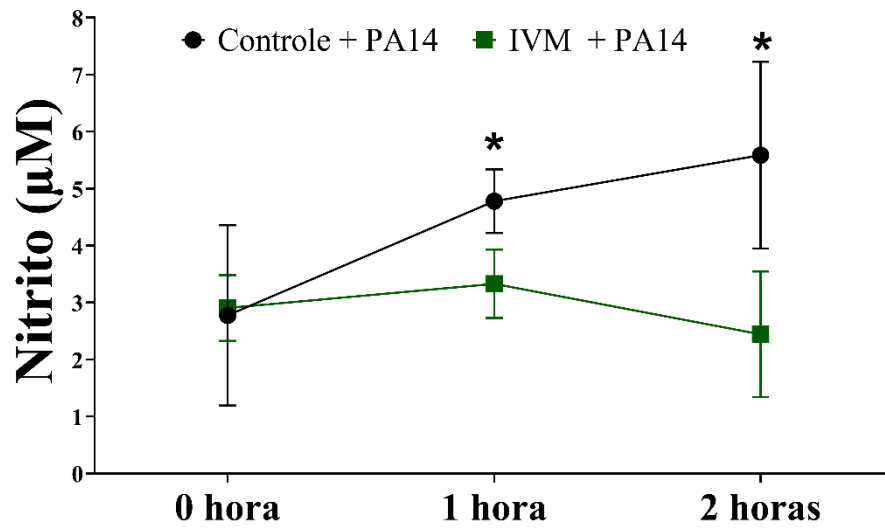
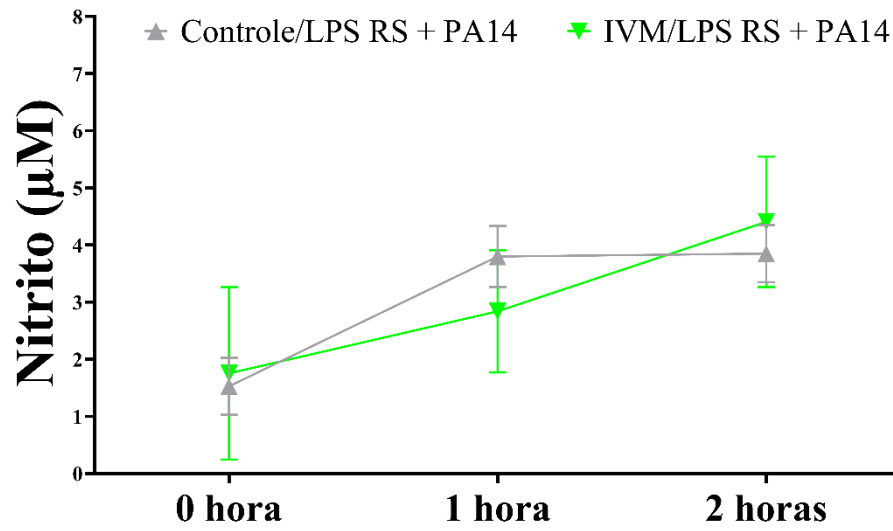
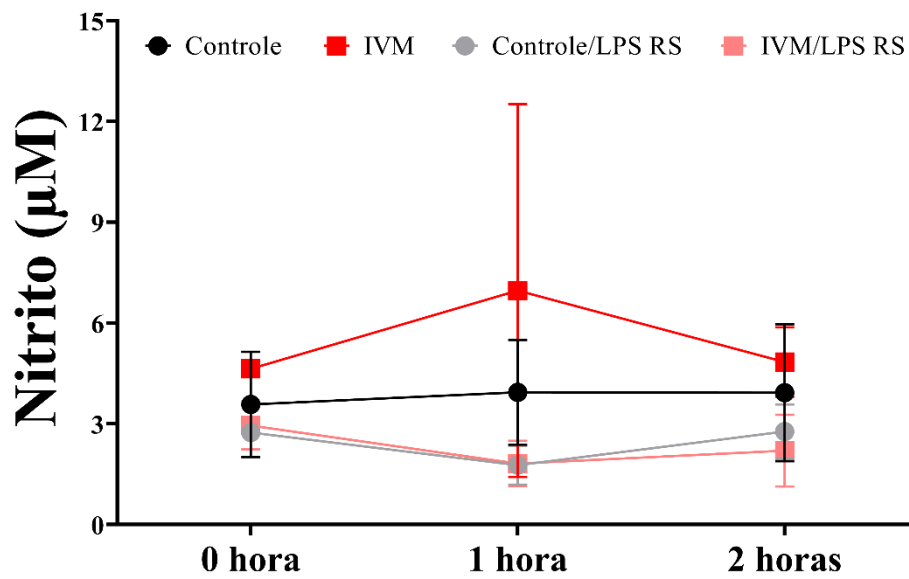


Legenda: Secreção de TNF- α por BMDM após 2 horas de infecção com PA14. Os macrófagos foram tratados ou não com ivermectina e/ou submetidos à inibição do complexo TLR4/MD-2 com LPS/RS. Os dados são expressos em pg/mL e apresentados como média \pm desvio

padrão de amostras em triplicata (n = 3 poços/grupo), representativas de três experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p \leq 0,05$. *Comparação com o grupo controle. #Comparação com o grupo tratado com ivermectina. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Ademais, a produção de óxido nítrico (NO), um importante mediador microbicida dos macrófagos, foi significativamente comprometida pelo tratamento com ivermectina. Nos BMDM infectados com PA14, observou-se redução significativa da secreção de nitrito, tanto 1 quanto 2 horas após a infecção, em comparação aos controles não tratados (Figura 13A). Quando o complexo TLR4/MD-2 foi inibido, a ivermectina deixou de suprimir a produção de NO, e uma tendência de aumento foi observada em ambos os tempos analisados, ainda que sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 13B). Em macrófagos não infectados, a secreção de NO permaneceu inalterada, independentemente do tratamento com ivermectina ou da inibição do complexo TLR4/MD-2 (Figura 13C).

Figura 13 - A ivermectina prejudica a secreção de NO por macrófagos infectados com PA14, sendo este efeito revertido pela inibição de TLR4/MD-2.

A**B****C**

Legenda: Produção de óxido nítrico, avaliada indiretamente pela quantificação de nitrito, em BMDM tratados ou não com ivermectina.

A) BMDM infectados com PA14.

B) BMDM infectados com PA14 após inibição do complexo TLR4/MD-2 com LPS/RS.

C) BMDM não infectados.

As análises foram realizadas em 0, 1 e 2 horas, sendo apresentados como média \pm desvio padrão de amostras em triplicata ($n = 3$ poços/grupo), representativas de três experimentos independentes. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $p \leq 0,05$.

*Comparação entre o grupo tratado ou não com ivermectina dentro do mesmo horário. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Em conjunto, embora a ivermectina não afete a viabilidade celular nem o metabolismo energético dos BMDM, o tratamento comprometeu a resposta microbicida contra *P. aeruginosa*, reduzindo a depuração intracelular da PA14 e suprimindo dois dos principais efetores dessa resposta testados, TNF- α e NO, de maneira dependente e/ou correlacionada à sinalização via TLR4/MD-2.

3.4 O tratamento com ivermectina diminuiu a carga bacteriana pulmonar em camundongos TLR4^{-/-} infectados com PA14, mas não em camundongos selvagens

Após as etapas *in silico* e *in vitro*, foram conduzidos ensaios *in vivo* em camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} para avaliar os efeitos da ivermectina em um modelo de pneumonia aguda por *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Os animais receberam ivermectina por cinco dias consecutivos (5 mg/kg/dia, via intraperitoneal) e, posteriormente, foram infectados por via intratraqueal com PA14. Durante o período de tratamento, a ivermectina não afetou o consumo alimentar nem o peso corporal dos animais (Figura 14A–B).

Figura 14 - O tratamento com ivermectina não alterou a ingestão de ração, nem o peso corporal dos camundongos.

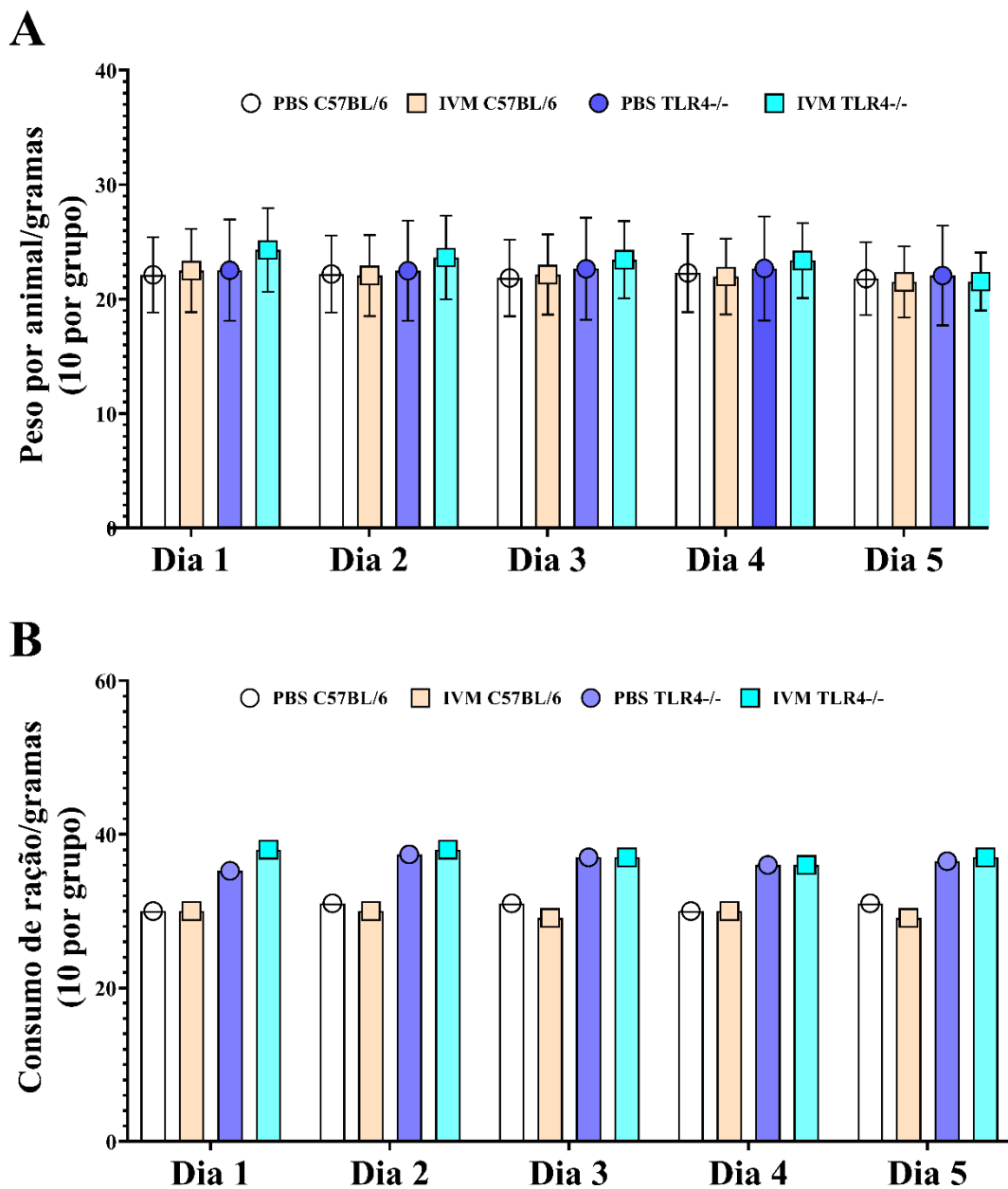


Figura 14: Peso corporal e consumo alimentar de camundongos tratados com ivermectina.

A) Peso corporal.

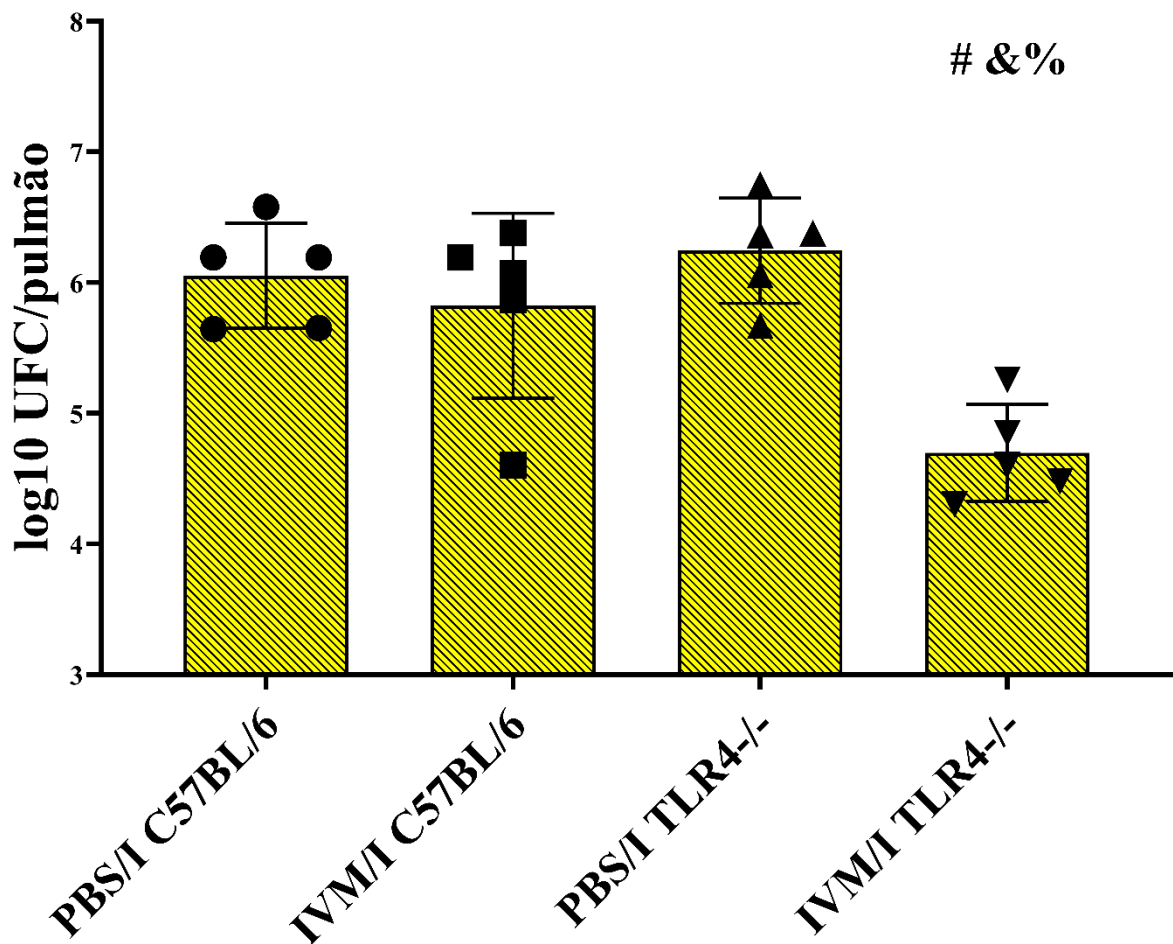
B) Consumo de ração.

Ambos os grupos C57BL/6 e/ou TLR4^{-/-} foram tratados com ivermectina na concentração de 5 mg/kg/dia, via intraperitoneal, ou PBS, durante cinco dias consecutivos. Os dados são apresentados por grupo e por dia de tratamento. Não foram observadas alterações no peso corporal ou no consumo alimentar associadas ao tratamento com ivermectina. As barras de erro representam a média \pm desvio padrão (N = 5 animais/grupo). Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Após o tratamento por cinco dias com ivermectina e a subsequente infecção intratraqueal com PA14, na multiplicidade de infecção de 1×10^5 UFCs por camundongo, a carga bacteriana pulmonar foi determinada 10 horas após a infecção e expressa como \log_{10} de UFC por pulmão/animal. Esse intervalo de tempo corresponde à fase aguda da pneumonia, na qual os mecanismos de imunidade inata exercem papel central no controle da proliferação bacteriana. Nos camundongos C57BL/6 selvagens, o tratamento com ivermectina não promoveu alterações significativas na carga bacteriana pulmonar quando comparado aos animais controle infectados e tratados apenas com PBS. Ambos os grupos exibiram níveis semelhantes de recuperação de PA14 nos pulmões, indicando que, na presença de sinalização funcional via TLR4, a ivermectina não modifica de maneira detectável a suscetibilidade do hospedeiro à infecção pulmonar aguda por PA14 (PBS/I C57BL/6 *versus* IVM/I C57BL/6).

Contudo, um padrão distinto foi observado nos animais TLR4^{-/-}. Os camundongos TLR4^{-/-} infectados e tratados apenas com PBS (PBS/I TLR4^{-/-}) apresentaram cargas bacterianas pulmonares semelhantes às observadas nos animais selvagens infectados, confirmando que a ausência de TLR4, isoladamente, não aumenta a suscetibilidade à pneumonia aguda por PA14 nesse modelo. No entanto, quando os animais TLR4^{-/-} foram previamente tratados com ivermectina e subsequentemente infectados (IVM/I TLR4^{-/-}), observou-se uma redução significativa na recuperação de bactérias viáveis nos pulmões, tanto em relação aos TLR4^{-/-} infectados não tratados quanto em relação aos grupos TLR4^{+/+} infectados, tratados ou não com ivermectina (Figura 15).

Figura 15 – O tratamento com ivermectina reduziu a recuperação de bactérias viáveis nos pulmões de camundongos infectados TLR4^{-/-}.



Legenda: Recuperação de bactérias viáveis nos pulmões de camundongos C57BL/6 (WT) e TLR4^{-/-} tratados com ivermectina ou PBS infectados com 1x10⁵ UFC de PA14. A carga bacteriana pulmonar foi determinada 10 horas após a infecção e expressa como log₁₀ de UFC por pulmão. As barras de erro representam a média ± desvio padrão, p ≤ 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. #Comparado ao grupo PBS/I C57BL/6; & comparado ao grupo IVM/I C57BL/6; %comparado ao grupo PBS/I TLR4^{-/-} (n = 5 animais/grupo). Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Esses resultados demonstram que a ivermectina exerceu um efeito protetor contra a infecção pulmonar por *P. aeruginosa* especificamente no contexto da deficiência de TLR4. Enquanto nos animais C57BL/6 a ivermectina não alterou a carga bacteriana pulmonar, nos animais TLR4^{-/-} o tratamento promoveu uma redução significativa da colonização bacteriana, indicando que seus efeitos imunomodulatórios *in vivo* favorecem mecanismos alternativos de controle da infecção quando a via clássica TLR4/MD-2 não está disponível.

3.5 O tratamento com ivermectina atenua os danos pulmonares e reduz o infiltrado inflamatório em camundongos infectados com *P. aeruginosa*

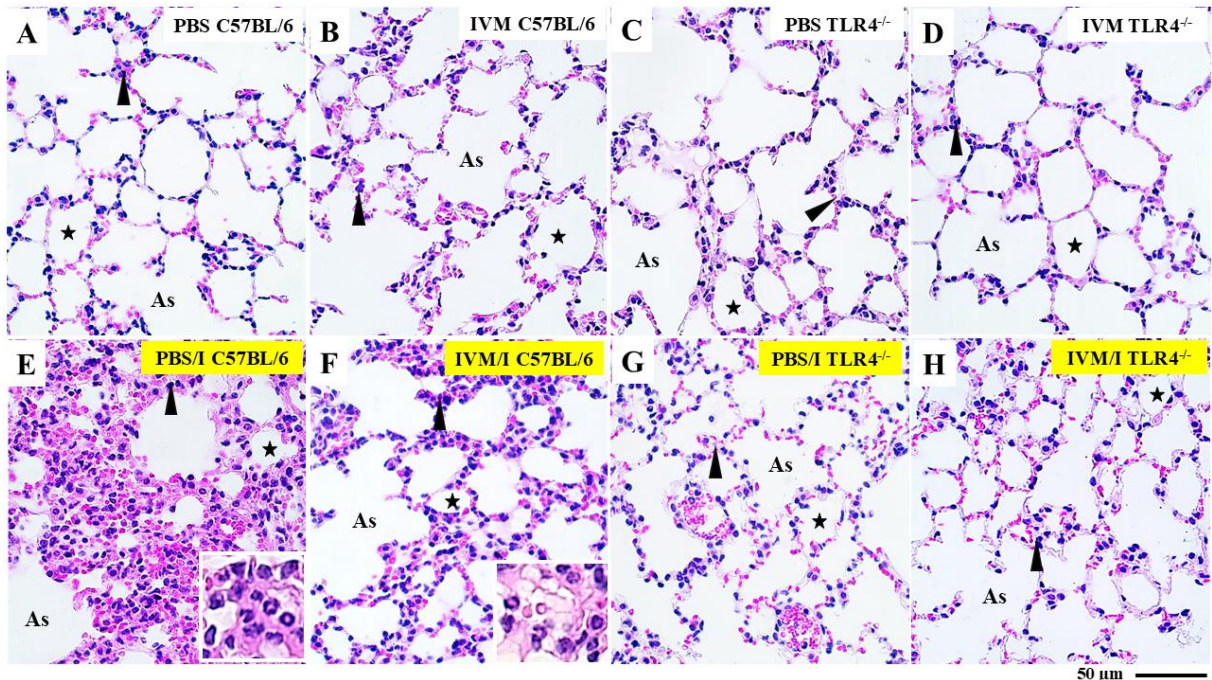
Após a verificação de que a ivermectina reduziu de forma significativa a carga bacteriana pulmonar em animais TLR4^{-/-} infectados por PA14, tornou-se essencial determinar se essa melhora no controle bacteriológico se refletia também na preservação estrutural do tecido pulmonar e em menor dano inflamatório. Para compreender o impacto funcional da ivermectina sobre a integridade do pulmão durante a infecção aguda, foi realizada a análise histopatológica e estereológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-}, tratados ou não com ivermectina e submetidos ou não à infecção por PA14.

Nos grupos não infectados, tanto C57BL/6 quanto TLR4^{-/-}, tratados ou não com ivermectina (PBS C57BL/6, IVM C57BL/6, PBS TLR4^{-/-} e IVM TLR4^{-/-}), o tecido pulmonar apresentou arquitetura histopatológica normal, caracterizada por sacos alveolares bem delimitados, septos alveolares finos e baixa celularidade intersticial. Esses parâmetros indicam preservação da organização histológica e ausência de inflamação ou colapso alveolar, demonstrando que a ivermectina, por si só, não induziu alterações estruturais no pulmão em condições basais (Figuras 16A–D).

Em contraste, a infecção por PA14 induziu alterações histopatológicas marcantes. Os animais C57BL/6 infectados e não tratados (PBS/I C57BL/6) exibiram espessamento acentuado dos septos alveolares, aumento expressivo da celularidade intersticial e infiltrado difuso de células polimorfonucleares e mononucleares. Essas alterações foram acompanhadas por colapso alveolar e acúmulo de neutrófilos, caracterizados morfologicamente, configurando um quadro de inflamação pulmonar intensa (Figura 16E). Nos animais C57BL/6 infectados tratados com ivermectina (IVM/I C57BL/6), essas alterações permaneceram evidentes, porém em menor intensidade, com redução parcial do espessamento septal, do colapso alveolar e do infiltrado inflamatório quando comparados aos controles infectados não tratados (Figura 16F). Nos camundongos TLR4^{-/-}, a infecção por PA14 resultou em um padrão de alterações histopatológicas mais atenuado. Tanto os animais PBS/I TLR4^{-/-} quanto os IVM/I TLR4^{-/-} apresentaram menor espessamento septal, menor infiltrado celular e melhor preservação da arquitetura alveolar quando comparados aos animais C57BL/6 infectados. Notavelmente, o tratamento com ivermectina em camundongos TLR4^{-/-} infectados promoveu maior preservação da microestrutura pulmonar, com septos mais

delgados, menor colapso alveolar e menor acúmulo de células polimorfonucleares e mononucleares (Figuras 16G–H).

Figura 16 - O tratamento com ivermectina melhorou os parâmetros histopatológicos pulmonares em camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} infectados com PA14.



Legenda: Imagens representativas da histopatologia pulmonar em campo claro de camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-}, tratados com ivermectina ou PBS e infectados ou não com PA14. Os pulmões foram coletados 10 horas após a infecção e corados com H&E.

A) PBS C57BL/6.

B) IVM C57BL/6.

C) PBS TLR4^{-/-}.

D) IVM TLR4^{-/-}.

E) PBS/I C57BL/6.

F) IVM/I C57BL/6.

G) PBS/I TLR4^{-/-}.

H) IVM/I TLR4^{-/-}.

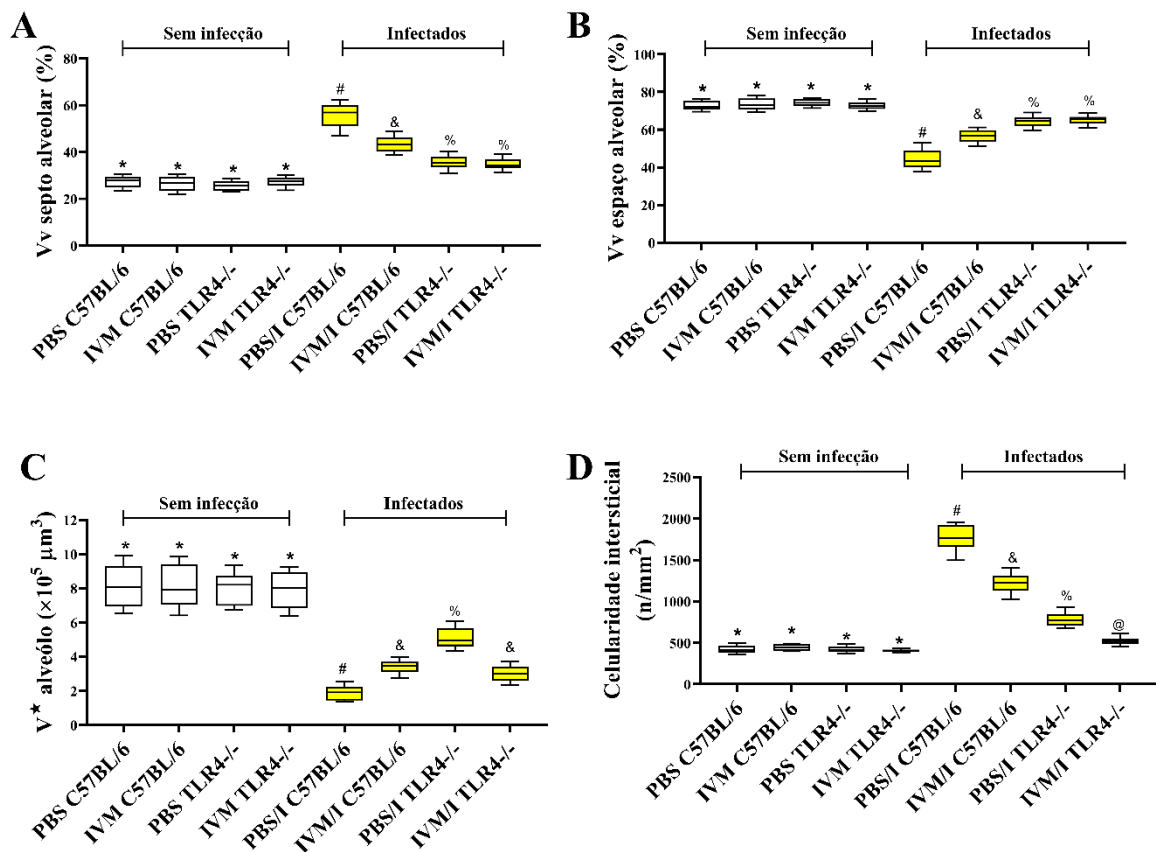
★: alvéolos; ▲: septo alveolar; As: saco alveolar. As áreas destacadas nos painéis PBS/I C57BL/6 e IVM/I C57BL/6 indicam infiltrado neutrofílico. Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

A análise estereológica confirmou quantitativamente esses achados histopatológicos. Todos os grupos infectados apresentaram aumento da densidade

volumétrica dos septos alveolares e redução proporcional do espaço de troca gasosa e do volume alveolar em relação aos grupos não infectados, refletindo o aumento do espessamento intersticial e o colapso alveolar induzidos pela infecção. Essas alterações foram mais pronunciadas nos animais PBS/I C57BL/6, seguidos pelos IVM/I C57BL/6, nos quais a ivermectina promoveu apenas uma melhora parcial dos parâmetros pulmonares. Nos camundongos TLR4^{-/-} infectados, essas alterações foram menos intensas, e o tratamento com ivermectina promoveu melhora adicional, resultando nos valores mais próximos da normalidade entre todos os grupos infectados (Figuras 17A–C).

Em relação à celularidade intersticial, utilizada como marcador quantitativo do infiltrado inflamatório, todos os grupos infectados apresentaram aumento significativo em comparação aos controles não infectados. O maior infiltrado foi observado nos animais PBS/I C57BL/6, enquanto esse parâmetro foi reduzido tanto pelo tratamento com ivermectina (IVM/I C57BL/6) quanto pela ausência de TLR4 (PBS/I TLR4^{-/-}). A menor celularidade intersticial foi observada nos camundongos TLR4^{-/-} tratados com ivermectina e infectados (IVM/I TLR4^{-/-}), evidenciando que a ausência de TLR4 associada ao tratamento com ivermectina foi necessária para a redução do infiltrado inflamatório pulmonar durante a pneumonia aguda por PA14 nos animais (Figura 17D).

Figura 17 - O tratamento com ivermectina melhorou os parâmetros esterológicos pulmonares em camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} infectados com PA14.



Legenda: Análise estereológica quantitativa da microestrutura pulmonar de camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-}, tratados com ivermectina ou PBS, infectados ou não PA14.

A) Densidade volumétrica (Vv) dos septos alveolares.

B) densidade volumétrica (Vv) do espaço alveolar.

C) volume alveolar médio (V* × 10⁵ μm³).

D) celularidade intersticial (células/mm²).

Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil. Diferentes símbolos (*, #, &, %, @) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, p ≤ 0,05 foi considerado estatisticamente significativo; grupos que compartilham o mesmo símbolo não diferem estatisticamente (p > 0,05).

Em conjunto, embora a infecção por PA14 induza desorganização estrutural significativa no tecido pulmonar, a ivermectina atenua essas alterações histológicas e estereológicas, com efeito mais evidente em camundongos TLR4^{-/-}, nos quais ocorre maior preservação da arquitetura pulmonar e menor inflamação tecidual local.

3.6 O tratamento com ivermectina reduziu a secreção de IL-6 e TNF- α e aumentou a secreção de IFN- γ e IL-17A nos pulmões de camundongos C57BL/6, com efeitos mais evidentes em camundongos TLR4^{-/-}

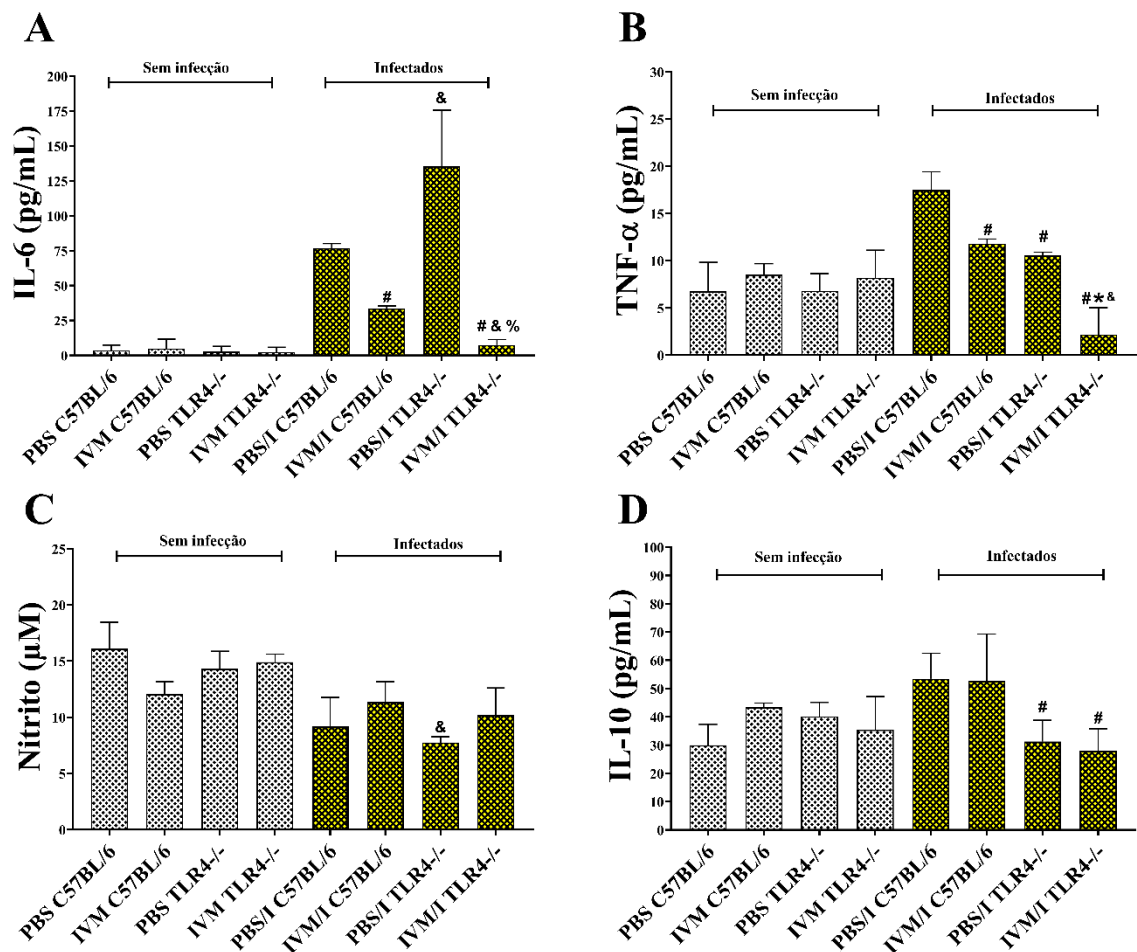
Após verificar que a ivermectina não apenas reduziu a carga bacteriana pulmonar em camundongos TLR4^{-/-}, mas também preservou de forma significativa a microarquitetura do tecido pulmonar e atenuou o infiltrado inflamatório durante a pneumonia aguda por PA14, foi investigado como esses efeitos estruturais se relacionavam com o perfil imunológico secretor de componentes humorais *in loco*. Em infecções por *P. aeruginosa*, a simples supressão da inflamação, marcada pela diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , não é suficiente para explicar a resolução do quadro infeccioso, sendo a ativação de resposta imune adaptativa, particularmente àquelas mediadas por linfócitos T CD4⁺, um componente central para o controle efetivo de bactérias extracelulares. Assim, a próxima etapa consistiu em avaliar se a ivermectina modulava o ambiente inflamatório pulmonar e a possível ativação de subpopulações de linfócitos T nos pulmões de camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} infectados com PA14.

A infecção pulmonar por PA14 induziu, como esperado, um aumento significativo na produção de citocinas pró-inflamatórias clássicas, particularmente IL-6 e TNF- α , nos pulmões dos animais C57BL/6 e TLR4^{-/-}, quando comparados aos grupos não infectados. Esse aumento é reflexo da intensa ativação pró-inflamatória desencadeada pela presença da PA14 no parênquima pulmonar. No entanto, o tratamento com ivermectina promoveu uma redução dessas duas citocinas nos animais infectados. Nos camundongos C57BL/6 tratados com ivermectina (IVM/I C57BL/6), observou-se uma diminuição tanto de IL-6 quanto de TNF- α em relação aos controles infectados tratados apenas com PBS. Essa redução foi ainda mais pronunciada nos camundongos TLR4^{-/-} tratados com ivermectina e infectados com PA14 (IVM/I TLR4^{-/-}), evidenciando que a ausência de TLR4 favoreceu o efeito menos inflamatório da ivermectina no pulmão durante a infecção por PA14 (Figuras 18A–B).

A quantificação de nitrito, que reflete a secreção de óxido nítrico no tecido pulmonar, não apresentou variações significativas entre os diferentes grupos experimentais, independentemente da infecção com PA14 ou do tratamento com ivermectina, indicando que, no contexto *in vivo*, a via do óxido nítrico não foi diferencialmente modulada pelo tratamento com ivermectina. De modo semelhante,

os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 permaneceram estáveis na maioria dos grupos, com exceção dos animais TLR4^{-/-} infectados, independentemente do tratamento com ivermectina, que exibiram níveis reduzidos dessa citocina em comparação aos animais C57BL/6 infectados, sugerindo uma regulação diferencial da resposta anti-inflamatória na ausência de TLR4, mas independente do tratamento com ivermectina (Figuras 18C–D).

Figura 18 - O tratamento com ivermectina reduziu a secreção de IL-6 e TNF- α no pulmão de camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} infectados com PA14.



Legenda: A ivermectina reduziu os níveis de IL-6 e TNF- α pulmonares em camundongos infectados por PA14, com efeito acentuado na ausência de TLR4. A concentração de citocinas e de nitrito foram determinadas em homogeneizados pulmonares de camundongos C57BL/6 e TLR4^{-/-} tratados com ivermectina ou PBS e infectados com PA14.

A) IL-6.

B) TNF- α .

C) NO, avaliado por quantificação de nitrito.

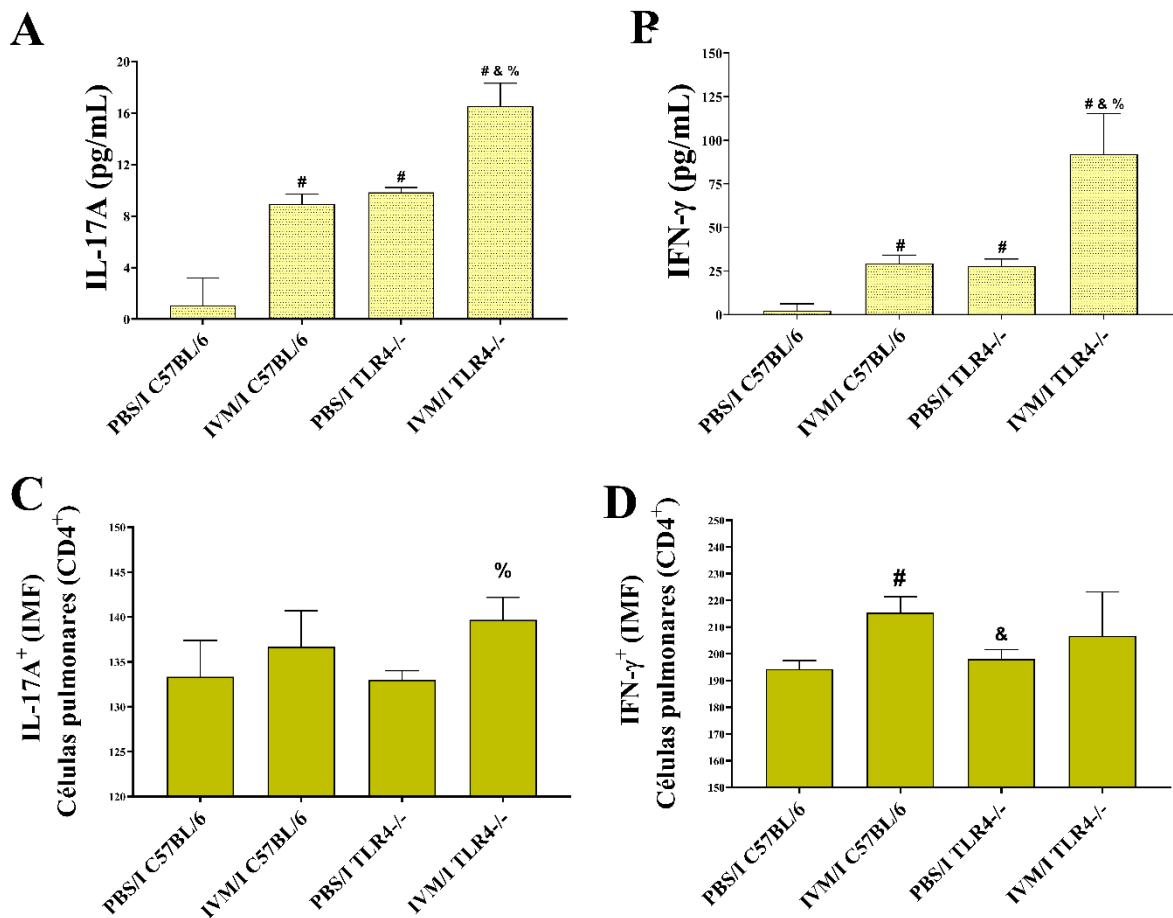
D) IL-10.

As barras de erro representam a média \pm desvio padrão, $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo de amostras em triplicata. #Comparado ao grupo PBS/I C57BL/6; &comparado ao grupo IVM/I C57BL/6; %comparado ao grupo PBS/I TLR4^{-/-} (n = 5 animais/grupo). Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Em paralelo à redução das citocinas inflamatórias clássicas, o tratamento com ivermectina refletiu em um aumento de citocinas associadas à imunidade adaptativa protetora contra *P. aeruginosa*. A infecção por PA14 induziu a produção pulmonar de IL-17A e IFN- γ exclusivamente nos grupos infectados, não sendo essas citocinas detectáveis nos animais não infectados. Nos camundongos C57BL/6 infectados e tratados com ivermectina, os níveis de IL-17A e IFN- γ foram significativamente maiores do que nos animais infectados não tratados, indicando que a ivermectina favorece a polarização da resposta imune para um perfil mais efetor e direcionado ao controle da infecção por PA14. Esse efeito foi ainda mais intenso nos camundongos TLR4^{-/-} tratados com ivermectina, nos quais os maiores níveis de IL-17A e IFN- γ entre todos os grupos experimentais foram observados (Figuras 19A–B).

A análise por citometria de fluxo dos linfócitos CD4⁺ pulmonares confirmou que esse aumento de citocinas estava diretamente associado à expansão funcional de subpopulações Th1 e Th17. Nos camundongos TLR4^{-/-} infectados com PA14 e tratados com ivermectina, houve um aumento na intensidade de fluorescência de células CD4⁺ positivas para IL-17A, indicando maior produção dessa citocina por células Th17 no tecido pulmonar em comparação aos TLR4^{-/-} infectados não tratados (Figura 19C). Já nos camundongos TLR4^{+/+} tratados com ivermectina, o principal efeito observado foi o aumento da intensidade de fluorescência de células CD4⁺ positivas para IFN- γ , evidenciando maior ativação da população Th1 nesses animais após a infecção por PA14 (Figura 19D).

Figura 19 - O tratamento com ivermectina aumentou a produção pulmonar de IL-17A e IFN- γ e promoveu a maior funcionalidade de subpopulações secretoras de IL-17A e IFN- γ em camundongos infectados com PA14.



Legenda: A ivermectina aumentou a secreção local de IL-17A e IFN- γ quantificado nos homogeneizados pulmonares dos camundongos infectados e direcionou a resposta imune adaptativa para perfis celulares secretores de IL-17A e IFN- γ no pulmão dos animais durante pneumonia por PA14.

A) IL-17A.

B) IFN- γ .

C) Intensidade média de fluorescência (IMF) de linfócitos T CD4⁺ IL-17A⁺.

D) Intensidade média de fluorescência (MFI) de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺, indicando maior ativação da população Th1 em camundongos TLR4^{+/+} tratados com ivermectina após infecção por PA14.

As barras de erro representam a média \pm desvio padrão, $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. [#]comparado ao grupo PBS/I C57BL/6; [&]comparado ao grupo IVM/I C57BL/6; [%]comparado ao grupo PBS/I TLR4^{-/-} (n = 5 animais/grupo). Fonte: adaptado de Belo e colaboradores (2025).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a ivermectina reprograma o microambiente imunológico pulmonar durante a pneumonia aguda por *P. aeruginosa*.

Ao mesmo tempo em que reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias associadas ao dano tecidual, como IL-6 e TNF- α , o tratamento suscitou uma resposta imunológica aumentada para citocinas da imunidade adaptativa, marcada pela maior concentração de IL-17A e IFN- γ , especialmente em camundongos TLR4^{-/-}. Essa combinação de menor pró-inflamação lesiva e maior responsividade imunológica efetora fornece uma potencial explicação mecânica para a redução da carga bacteriana e a preservação estrutural do pulmão observadas anteriormente nesses animais.

4.0 DISCUSSÃO

A ivermectina é um fármaco amplamente empregado na prática da medicina alopática e, mais recentemente, tem despertado interesse por potenciais aplicações que extrapolam suas propriedades antiparasitárias. Essas novas indicações evidenciam lacunas relevantes no conhecimento sobre seus efeitos nos sistemas de mamíferos, como, por exemplo, a sua capacidade de modular a microbiota intestinal e suas possíveis implicações em terapias oncológicas, ambas aplicações que podem impactar de forma significativa a imunofisiologia do hospedeiro (BELO *et al.*, 2025; DOU *et al.*, 2016). Neste trabalho, foi demonstrado que a ivermectina se liga ao correceptor MD-2 associado ao TLR4, uma interação que, em condições *in vitro*, resultou em modulação imune prejudicial em macrófagos, mas que, de maneira contrastante, promoveu o aumento da responsividade imune em camundongos deficientes em TLR4 submetidos à pneumonia bacteriana por *P. aeruginosa*.

A atividade imunomoduladora da ivermectina já havia sido proposta em estudos prévios, indicando que seus efeitos farmacológicos extrapolam o escopo estritamente antiparasitário. Khakh e colaboradores (1999) demonstraram que a ivermectina atua como um ativador alostérico positivo, específico e reversível dos receptores P2X4, os quais pertencem à família de canais catiônicos não seletivos regulados por ATP extracelular. Esses receptores, quando ativados, permitem o influxo de íons sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}) para o interior da célula, simultaneamente ao efluxo de íons potássio (K^+), configurando um mecanismo capaz de influenciar de maneira direta a ativação e a funcionalidade das células imunes. Ademais, Csóka e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com ivermectina promoveu aumento significativo da sobrevivência de camundongos submetidos à sepse induzida por *Escherichia coli*, efeito que foi atribuído a mecanismos dependentes da ativação dos receptores P2X4. Dessa forma, esses trabalhos estabeleceram uma base experimental consistente para a noção de que a ivermectina exerce efeitos imunomoduladores mediados por P2X4, os quais são relevantes em contextos de infecção sistêmica e resposta inflamatória exacerbada.

A ivermectina também foi caracterizada como um fármaco capaz de modular de forma direta as respostas mediadas por linfócitos T em modelos *in vivo*, indicando que seus efeitos imunológicos se estendem ao compartimento da imunidade adaptativa. Em camundongos, foi demonstrado que a ivermectina exerceu um efeito

protetor no modelo de encefalomielite autoimune experimental por meio da regulação do balanço funcional entre células Th17 e células T reguladoras, mediado especificamente pela via de sinalização dependente de IL-2 e STAT5 (XIE *et al.*, 2023). Esse mecanismo sugere que a ivermectina interfere em circuitos moleculares que controlam a diferenciação e a estabilidade fenotípica dos linfócitos T.

De forma consistente com essa ação sobre subpopulações de linfócitos, em cabras infectadas pelo *Capra hircus papillomavirus*, a administração repetida de ivermectina promoveu aumento da razão CD4⁺/CD8⁺, associado à redução dos níveis periféricos de linfócitos T CD8⁺, indicando uma reorganização quantitativa de linfócitos T induzida pelo fármaco (BOZKURT *et al.*, 2023). Além disso, outros estudos demonstraram que a ivermectina atua sobre o complexo heterodimérico de importina IPO α/β , um sistema essencial para o transporte nuclear de proteínas, levando à redução da proliferação de linfócitos T infectados pelo vírus da leucemia de células T humanas do tipo 1. Esse efeito destacou a ivermectina como um potencial agente terapêutico no contexto da leucemia/linfoma de células T do adulto (SHIKAWA *et al.*, 2021). Em conjunto, esses achados sustentam que, para além de sua ação sobre os receptores P2X4, a ivermectina exerce efeitos moduladores relevantes sobre a imunidade adaptativa mediada por linfócitos T.

Os resultados obtidos nesta tese demonstraram que o tratamento com ivermectina, de forma isolada, não promoveu ativação da via de sinalização do NF- κ B em macrófagos RAW 264.7. No entanto, quando essas células foram previamente expostas à ivermectina e posteriormente estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano, observou-se intensificação da ativação do NF- κ B, efeito que foi revertido pela inibição do complexo TLR4/MD-2. Esse comportamento é compatível com os dados de acoplamento molecular *in silico*, que evidenciaram a ligação da ivermectina ao correceptor MD-2, o qual forma um complexo funcional com o TLR4, fornecendo uma base mecânica para a modulação observada da via de sinalização.

Zhang e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com ivermectina aumentou a sobrevivência de camundongos submetidos a uma dose letal de LPS por meio da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias dependente do bloqueio do NF- κ B. De maneira semelhante, Jiang e colaboradores (2019) mostraram que a ivermectina foi capaz de reverter a resistência a fármacos em células tumorais ao inibir vias intracelulares, incluindo a via do NF- κ B, resultando em redução da transcrição da glicoproteína P (P-gp). Em contraste com esses achados, os dados

apresentados neste estudo indicaram que a ivermectina aumentou a sinalização de NF- κ B em condições *in vitro*, o que reforça a hipótese de que esse efeito decorre predominantemente da interação do fármaco com o correceptor MD-2 do complexo TLR4, e não de uma ação direta sobre os componentes intracelulares da via do NF- κ B. Apesar da amplificação da ativação de NF- κ B, o tratamento com ivermectina resultou em diminuição da secreção de TNF- α , indicando que a ativação dessa via não se traduziu em uma resposta pró-inflamatória clássica. Esse padrão sugere que a sinalização a jusante do NF- κ B foi seletivamente modulada pela ivermectina, favorecendo potenciais saídas regulatórias em detrimento da indução de mediadores inflamatórios típicos. Em conjunto, esses resultados evidenciam um modo distinto de regulação da via do NF- κ B sob a influência da ivermectina, apontando para a necessidade de investigações mecanísticas adicionais para elucidar os processos moleculares subjacentes.

O tratamento com ivermectina comprometeu de forma significativa a capacidade de eliminação intracelular de *P. aeruginosa* por macrófagos em condições *in vitro*, sendo esse efeito diretamente refletido pela diminuição da secreção de NO e de TNF- α , sem que houvesse qualquer alteração na viabilidade celular. Esse padrão indica que a redução da atividade microbicida não decorreu de citotoxicidade, mas de uma modulação funcional das respostas efetoras desses macrófagos. Zhang e colaboradores (2009) demonstraram previamente que a ivermectina inibiu a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS, o que fornece uma base consistente para a interpretação de que a diminuição da depuração bacteriana observada nos experimentos do presente estudo está associada à redução da disponibilidade dessa espécie reativa de nitrogênio, essencial para a atividade bactericida de macrófagos (ZHANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009).

De modo complementar, Gossein e colaboradores (1995) demonstraram que camundongos infectados com *P. aeruginosa* apresentam aumento da expressão de TNF- α durante as fases iniciais da infecção, sendo esse aumento funcionalmente relevante, uma vez que o bloqueio desse mediador por meio de anticorpos anti-TNF- α resultou em maior recuperação de bactérias viáveis nos pulmões. Assim, a redução da depuração de PA14 observada em macrófagos tratados com ivermectina pode também ser atribuída à diminuição da secreção de TNF- α induzida pelo fármaco *in vitro*, comprometendo um eixo central da resposta inflamatória protetora contra bactérias extracelulares. Esse mesmo padrão de redução de TNF- α foi igualmente

observado em macrófagos RAW 264.7 tratados com ivermectina e posteriormente estimulados com LPS, o que é consistente com a interação da ivermectina com o complexo receptor TLR4/MD-2, previamente demonstrada. De forma particularmente relevante, a supressão da secreção de TNF- α e de óxido nítrico foi revertida quando o complexo TLR4/MD-2 foi farmacologicamente inibido, indicando que os efeitos da ivermectina sobre esses mediadores microbicidas dependem da integridade desse eixo de reconhecimento.

Macrófagos com fenótipo pró-inflamatório, classificados como M1, caracterizam-se por um aumento da captação de glicose e por uma mudança do metabolismo energético da fosforilação oxidativa mitocondrial para vias predominantemente fermentativas, o que resulta em maior produção de lactato (VIOLA *et al.*, 2019). Esse processo de reprogramação metabólica permite a geração rápida de ATP e, ao mesmo tempo, reforça a sinalização imune por meio do acúmulo de metabólitos, o qual atua na estabilização do fator induzível por hipóxia 1-alfa e, conseqüentemente, favorece a expressão de citocinas pró-inflamatórias (YE *et al.*, 2022). No entanto, no presente estudo, esse padrão clássico de reprogramação metabólica não foi detectado. Os macrófagos avaliados exibiram níveis semelhantes de consumo de glicose e de secreção de lactato, independentemente de terem sido tratados com ivermectina ou não, bem como independentemente da presença ou ausência de infecção por *P. aeruginosa*. Esses resultados indicam que, nas condições experimentais empregadas, a ivermectina e a infecção bacteriana não promoveram alterações mensuráveis no metabolismo glicolítico ou na produção de lactato associadas ao fenótipo pró-inflamatório.

Em modelos *in vivo*, o tratamento com ivermectina não modificou a recuperação de bactérias viáveis nos pulmões, em concordância com os achados previamente reportados pelo nosso grupo (BELO *et al.*, 2023). Apesar disso, a administração do fármaco resultou em melhora significativa dos parâmetros histopatológicos pulmonares, além de promover redução da secreção local de IL-6 e TNF- α . Essas alterações são compatíveis com uma atenuação do processo inflamatório pulmonar e podem estar diretamente relacionadas à diminuição do dano tecidual induzido pela infecção bacteriana. A redução dos níveis de TNF- α observada nos animais tratados foi consistente com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, indicando que os efeitos imunomoduladores da ivermectina sobre esse mediador inflamatório se mantêm entre os diferentes sistemas experimentais. Entretanto, o fato de a recuperação de bactérias

viáveis nos pulmões permanecer inalterada nos camundongos do tipo selvagem, ao passo que foi reduzida nos animais deficientes em TLR4, sugere que outros componentes da resposta imune tenham sido modulados pela ivermectina. Nesse contexto, observou-se o aumento dos níveis de IL-17A e IFN- γ nos pulmões dos animais infectados e tratados com ivermectina, com um aumento ainda mais acentuado nos camundongos TLR4^{-/-}. Essas citocinas, produzidas por linfócitos T auxiliares e/ou por células linfoides inatas, estão associadas a desfechos mais favoráveis na pneumonia causada por *P. aeruginosa* (SHINDO *et al.*, 2017; MUNTAKA *et al.*, 2019), o que indica que a modulação desses eixos imunológicos pode ter contribuído para a melhora dos parâmetros pulmonares e para a maior eficiência no controle da infecção observada nos grupos tratados com ivermectina, em especial nos camundongos TLR4^{-/-}.

Happel e colaboradores (2005) evidenciaram a importância central das citocinas IL-17 e IFN- γ na defesa imunológica pulmonar contra *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando que a ausência desses mediadores resultou em aumento significativo da mortalidade em camundongos. Esses dados consolidam o papel dessas citocinas na coordenação de respostas imunes eficazes no trato respiratório durante infecções bacterianas. De forma convergente, estudos voltados ao desenvolvimento de vacinas têm buscado identificar alvos capazes de intensificar respostas imunológicas mediadas por IL-17 como estratégia para aumentar a proteção contra a infecção por *P. aeruginosa* (SHAINKH *et al.*, 2022). Nesse contexto, o aumento dos níveis de IL-17A e IFN- γ observado após o tratamento com ivermectina sugere que esse fármaco atua por meio de receptores adicionais e/ou vias de sinalização intracelular distintas daquelas previamente caracterizadas neste trabalho, promovendo maior produção dessas citocinas por linfócitos T e/ou por células linfoides inatas. Tal modulação indica que a ivermectina influencia componentes específicos da resposta imune que estão diretamente associados a mecanismos de proteção em infecções pulmonares bacterianas. Esse conjunto de observações reforça a necessidade de investigações adicionais voltadas à identificação dos alvos moleculares e das vias de sinalização envolvidas nessa resposta específica induzida e/ou potencializada pela ivermectina.

De forma particularmente relevante, os camundongos deficientes em TLR4 tratados com ivermectina apresentaram desfechos mais favoráveis frente à infecção por *P. aeruginosa* quando comparados tanto aos animais TLR4^{-/-} não tratados quanto aos camundongos C57BL/6, independentemente do uso de ivermectina. Esses

animais exibiram menor recuperação de bactérias viáveis nos pulmões e melhora dos parâmetros histopatológicos pulmonares, indicando uma resposta imune mais eficiente no controle da infecção. Em consonância com esses achados, Ramphal e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos TLR4^{-/-} não apresentam maior suscetibilidade à infecção pulmonar aguda por *P. aeruginosa*, uma vez que as cargas bacterianas e as contagens de neutrófilos nos pulmões foram semelhantes entre animais C57BL/6 e TLR4^{-/-} após a infecção. Esses dados sustentam a afirmação de que a suscetibilidade à pneumonia aguda causada por *P. aeruginosa* não depende diretamente da sinalização mediada por TLR4. Nesse contexto, a observação de que camundongos TLR4^{-/-} tratados com ivermectina foram menos suscetíveis à infecção por PA14, apresentando melhor preservação da histoarquitetura pulmonar em comparação com os controles TLR4^{-/-} infectados e não tratados, sugere que a ivermectina exerce seus efeitos por meio de outros receptores fisiológicos não seletivos ou por vias compensatórias capazes de suprir a ausência da sinalização mediada pelo eixo TLR4/MD-2.

O tratamento com ivermectina resultou em melhora estatisticamente significativa dos parâmetros estereológicos pulmonares, especialmente nos camundongos deficientes em TLR4, refletindo maior preservação da estrutura pulmonar nesse grupo. Além disso, a administração de ivermectina resultou em redução do infiltrado inflamatório, marcada pela diminuição da celularidade no tecido pulmonar dos animais infectados, alteração que apresentou correlação direta com a diminuição da secreção local de TNF- α e IL-6. Esses efeitos juntamente à proteção tecidual foram mais pronunciados nos camundongos TLR4^{-/-} tratados com ivermectina, sugerindo que a ausência da sinalização mediada por TLR4 potencializa a ação moduladora do fármaco sobre a inflamação pulmonar *in loco*. Esse perfil de resposta está de acordo com os achados descritos por Ma e colaboradores (2022), que demonstraram que a ivermectina foi capaz de atenuar a lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos, reforçando a consistência dos efeitos observados sobre a redução do dano inflamatório no pulmão.

Da mesma forma, os dados obtidos neste trabalho e os resultados recentemente descritos por Noori, Sureda e Shirooie (2025) permitem uma compreensão mais abrangente e mecanisticamente consistente do papel imunomodulador da ivermectina. Enquanto este trabalho demonstrou que a ivermectina promoveu aumento da ativação de NF- κ B em macrófagos estimulados por

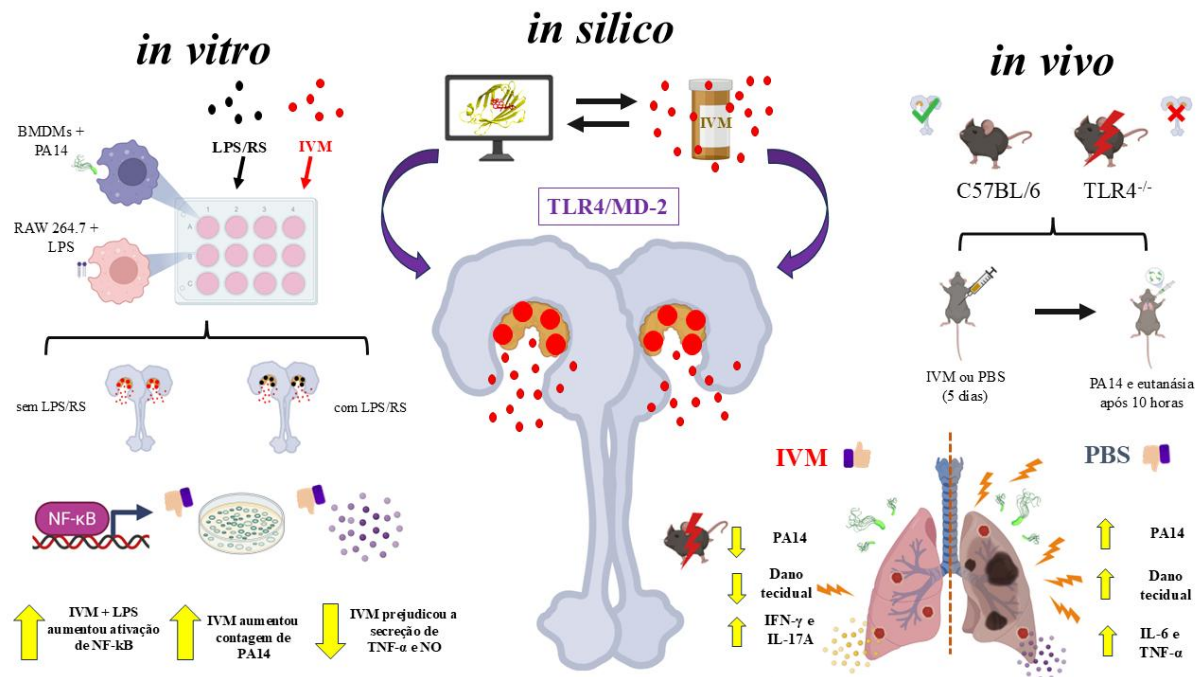
LPS, esse efeito não se traduziu em amplificação da resposta inflamatória clássica, uma vez que houve redução significativa da secreção de TNF- α , óxido nítrico e outros mediadores pró-inflamatórios *in vitro* e posteriormente verificados *in vivo*, evidenciando uma dissociação funcional entre a ativação do fator de transcrição e a resposta efetora inflamatória. Por outro lado, no modelo de psoríase induzida por imiquimode, caracterizado por inflamação cutânea crônica e desregulada, o tratamento tópico com ivermectina resultou na redução da expressão de TLR4 e da ativação nuclear de NF- κ B, acompanhada por melhora dos índices de gravidade da área da psoríase e da histopatologia das lesões nos camundongos (NOORI; SUREDA; SHIROOIE, 2025). A integração desses dados sugere que a ivermectina é capaz de preservar sinais iniciais de ativação necessários a uma resposta imune adequada e regulada, ao mesmo tempo em que limita a sustentação e a propagação imunopatológica da inflamação, conferindo um efeito imunoprotetor tanto em cenários de infecção bacteriana aguda pulmonar quanto em doenças inflamatórias crônicas, como a psoríase.

5.0 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a ivermectina se liga ao correceptor MD-2 do complexo TLR4/MD-2, indicando uma interação direta com um componente central da sinalização da imunidade inata por meio de análise *in silico*. Essa interação associou-se à modulação da resposta imune *in vitro* em macrófagos e à alteração de parâmetros inflamatórios *in vivo*, com efeitos mais evidentes em camundongos deficientes para TLR4. Em macrófagos, a ivermectina comprometeu a depuração intracelular de *P. aeruginosa* e promoveu a ativação da via do NF- κ B, sem aumento concomitante da secreção de TNF- α . Esses efeitos foram revertidos pela inibição do complexo TLR4/MD-2, indicando a dependência dessa via para os efeitos observados.

No modelo murino de infecção, particularmente em animais deficientes para TLR4, o tratamento com ivermectina reduziu a suscetibilidade à pneumonia aguda induzida pela cepa PA14 de *P. aeruginosa*. Observou-se melhora da histoarquitetura pulmonar, aumento na produção de IL-17A e IFN- γ , redução do infiltrado inflamatório e diminuição da carga bacteriana pulmonar, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 20). Em conjunto, os resultados indicam que a ivermectina exerce um papel imunomodulador, uma vez que, apesar de inibir mecanismos microbicidas clássicos em macrófagos *in vitro*, promoveu *in vivo* uma resposta imune protetora mais eficaz na ausência da sinalização mediada por TLR4.

Figura 20 - Representação esquemática dos efeitos da ivermectina sobre a resposta imune inata e adaptativa de camundongos durante infecção por *P. aeruginosa*.



Legenda: Em análises *in silico*, a ivermectina apresentou alta afinidade de ligação ao componente MD-2 do complexo TLR4/MD-2, modulando a sinalização dependente de NF-κB em macrófagos. Em ensaios *in vitro*, o tratamento com ivermectina prejudicou a atividade microbicida de macrófagos, resultando em maior recuperação de bactérias viáveis, com redução da secreção de TNF-α e óxido nítrico (NO), efeitos revertidos pela inibição do complexo TLR4/MD-2. Em modelo *in vivo* de pneumonia aguda por *P. aeruginosa*, a ivermectina atenuou o dano pulmonar e a inflamação, com redução da carga bacteriana, particularmente em camundongos TLR4^{-/-}, associada ao aumento de respostas mediadas por IL-17 e IFN-γ e à diminuição de IL-6 e TNF-α. Fonte: Adaptado de Belo e colaboradores (2025)

Esses dados abrem perspectivas para investigações futuras sobre os efeitos imunofarmacológicos da ivermectina em diferentes contextos imunofisiológicos. Estudos adicionais devem ser conduzidos a fim de identificar possíveis alvos moleculares associados ao aumento da produção de IFN-γ e IL-17 nos quais a ivermectina possa atuar, bem como o papel de populações celulares específicas em processos infecciosos. Além disso, a avaliação do efeito da ivermectina em outros modelos de infecção bacteriana e de sua possível associação com terapias antimicrobianas antibacterianas e imunofarmacológicas convencionais pode ampliar sua aplicabilidade terapêutica em contextos infecciosos. Assim, os resultados apresentados sustentam o potencial da ivermectina como agente imunofarmacológico e indicam alvos moleculares e celulares relevantes para futuras abordagens

terapêuticas no controle de *P. aeruginosa* e de patógenos relacionados. Todos os resultados deste trabalho encontram-se publicados (BELO *et al.*, 2025), e a primeira página do artigo encontra-se disponível no Apêndice A.

6.0 REFERÊNCIAS

- AKASHI, S. *et al.* Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3471–3475, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.164.7.3471.
- ALKALAY, I. *et al.* Stimulation-dependent I κ B α phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 23, p. 10599–10603, 1995. DOI: 10.1073/pnas.92.23.10599.
- ALMEIDA, L. A. de *et al.* MyD88 and STING signaling pathways are required for IRF3-mediated IFN- β induction in response to *Brucella abortus* infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, e23135, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023135.
- ATMAKURI, S. *et al.* Forging ahead the repositioning of multitargeted drug ivermectin. **Current Drug Delivery**, v. 20, n. 8, p. 1049-1066, 2022. DOI: 10.2174/1567201819666220516163242.
- BAI, Y. *et al.* Disulfiram blocks inflammatory TLR4 signaling by targeting MD-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 31, e2306399120, 2023. DOI: 10.1073/pnas.2306399120.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- BAYES, H. K.; RITCHIE, N. D.; EVANS, T. J. Interleukin-17 is required for control of chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 12, p. 3507–3516, 2016. DOI: 10.1128/IAI.00717-16.
- BELO, T. C. A. *et al.* Ivermectin impact over gut microbiota diversity: a comprehensive and updated analysis from pre-clinical and clinical evaluations. **The Microbe**, v. 7, 2025, 100318. DOI: 10.1016/j.microb.2025.100318.
- BELO, T. C. A. *et al.* Ivermectin modulates macrophage activity and enhances bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2025. DOI: 10.1007/s11010-025-05419-4.
- BELO, T. C. A. *et al.* Ivermectin-induced bacterial gut dysbiosis does not increase susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection but exacerbates liver damage. **Microbes and Infection**, v. 25, n. 4, 105080, 2023. DOI: 10.1016/j.micinf.2022.105080.
- BELO, V. A. *et al.* The role of IL-10 in immune responses against *Pseudomonas aeruginosa* during acute lung infection. **Cell and Tissue Research**, v. 383, p. 1123–1133, 2021. DOI: 10.1007/s00441-020-03308-4.

BEN HAJ KHALIFA, A. *et al.* Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. **Annales de Biologie Clinique (Paris)**, v. 69, n. 4, p. 393–403, 2011. DOI: 10.1684/abc.2011.0589.

BONNEAU, A. *et al.* Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. **Scientific Reports**, v. 10, art. 241, 10 jan. 2020. DOI: 10.1038/s41598-019-56913-x.

BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 26–47, 2019. DOI: 10.1016/j.drug.2019.07.002.

BOUCHER, J. C. *et al.* Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 9, p. 3838–3846, 1997. DOI: 10.1128/IAI.65.9.3838-3846.

BOZKURT, G. *et al.* The effect of multiple-dose ivermectin treatment on CD4⁺/CD8⁺ and the oxidative stress index in goats with udder viral papillomatosis. **Research in Veterinary Science**, v. 157, p. 17–25, 2023. DOI: 10.1016/j.rvsc.2023.02.006.

BUCIOR, I.; PIELAGE, J. F.; ENGEL, J. N. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4: e1002616, 2012. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002616.

CALY, L. *et al.* The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 178, 2020. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104787.

CANGA, G. A. *et al.* The pharmacokinetics and interactions of ivermectin in humans — a mini-review. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 1, p. 42–46, 2008. DOI: 10.1208/s12248-007-9000-9.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011. DOI: 10.1128/MMBR.00031-10.

CASILAG, F. *et al.* The LasB elastase of *Pseudomonas aeruginosa* acts in concert with alkaline protease AprA to prevent flagellin-mediated immune recognition. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 1, p. 162–171, jan. 2016. DOI: 10.1128/IAI.00939-15.

CEBINELLI, G. C. M. *et al.* CCR2-deficient mice are protected to sepsis by the disruption of the inflammatory monocytes emigration from the bone marrow. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 109, n. 6, p. 1063–1070, 2021. DOI: 10.1002/JLB.4MR0820-049RR.

CHAPPLE, I. L. C. *et al.* The role of the host — neutrophil biology. **Periodontology** **2000**, 2023. DOI: 10.1111/prd.12490.

CHEN, K. W. *et al.* The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 β maturation without pyroptosis during acute *Salmonella* challenge. **Cell Reports**, v. 8, n. 2, p. 570–582, 2014. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.028.

CHEN, N. *et al.* Toxic effects of avermectin on liver function, gut microbiota, and colon barrier in the rat model. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 284, 116964, 2024. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116964.

CHOUDHARY, R.; SHARMA, A. K. Potential use of hydroxychloroquine, ivermectin and azithromycin drugs in fighting COVID-19: trends, scope and relevance. **New Microbes and Infections**, v. 35, 2020. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100684

CRUMP, A. Ivermectin: enigmatic multifaceted “wonder” drug continues to surprise and exceed expectations. **Journal of Antibiotics**, Tokyo. 2017. DOI: 10.1038/ja.2017.11.

CSÓKA, B. *et al.* Macrophage P2X4 receptors augment bacterial killing and protect against sepsis. **JCI Insight**, v. 3, n. 11, 2018. DOI: 10.1172/jci.insight.99431.

CUPERTINO, M. C. *et al.* Cadmium-induced testicular damage is associated with mineral imbalance, increased antioxidant enzymes activity and protein oxidation in rats. **Life Sciences**, v. 175, p. 23–30, 2017. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.03.007.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods in Molecular Biology**, v. 1263, p. 243–250, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2269-7.

DE ALMEIDA, L. A. *et al.* Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 5, p. 1654–1662, 2013. DOI: 10.1128/IAI.00548-12.

DE MELO, G. D. *et al.* Attenuation of clinical and immunological outcomes during SARS-CoV-2 infection by ivermectin. **EMBO Molecular Medicine**, v. 13, n. 8, e14122, 2021. DOI: 10.15252/emmm.202114122.

DENNING, G. M. *et al.* *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5777–5784, 1998. DOI: 10.1128/IAI.66.12.5777-5784.1998.

DOU, Q. *et al.* Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. **Cancer Research**, v. 76, n. 15, p. 4457–4469, 2016. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2887.

FELIZARDO, A. A. *et al.* Impact of *Trypanosoma cruzi* infection on nitric oxide synthase and arginase expression and activity in young and elderly mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 129, p. 227–236, 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.031.

- FERNANDEZ-BILLÓN, M. *et al.* Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Biofilm**, v. 5, art. 100129, 2023. DOI: 10.1016/j.biofilm.2023.100129.
- FISCHER, P. U. *et al.* Potential value of triple drug therapy with ivermectin, diethylcarbamazine, and albendazole (IDA) to accelerate elimination of lymphatic filariasis and onchocerciasis in Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, e0005163, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005163.
- FOULKES, D. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, art. 707, 16 dez. 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7120707.
- FRIEMAN, M *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/golgi membrane. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 9812-9824, 2017. DOI: 10.1128/JVI.01012-07.
- FU, J.; WU, H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation. **Annual Review of Immunology**, v. 41, p. 301–316, 2023. DOI: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207.
- GALLI, G.; SALEH, M. Immunometabolism of macrophages in bacterial infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, art. 607650, 29 jan. 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2020.607650.
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013. DOI: 10.1111/2049-632X.12033.
- GOLDBERG, J. B.; PLER, G. P. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 490–494, dez. 1996. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)82911-3.
- GOSSELIN, D. *et al.* Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3272–3278, 1995. DOI: 10.1128/IAI.63.8.3272-3278.1995.
- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signalling**, v. 13, p. 85–94, 2001.
- HA, D.-G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014.
- HAPPEL, K. I. *et al.* Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 6, p. 761–769, 2005. DOI: 10.1084/jem.20050193.

- HARDY, K. S. *et al.* Perspectives on the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system effector ExoU and its subversion of the host innate immune response to infection. **Toxins**, v. 13, n. 12, art. 880, 9 dez. 2021. DOI: 10.3390/toxins13120880.
- HAZLETT, L. D. Pathogenic mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis: a review of the role of T cells, Langerhans cells, PMN, and cytokines. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 5-6, p. 383–390, 2002. DOI: 10.1089/10445490260099665.
- HEIDARY, F.; GHAREBAGHI, R. Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, p. 593-602, 2020. DOI: 10.1038/s41429-020-0336-z.
- HOFMANN, L. *et al.* Advances in understanding of the copper homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, art. 2050, 2021. DOI: 10.3390/ijms22042050.
- ISHIKAWA, C.; SENBA, M.; MORI, N. Importin β 1 regulates cell growth and survival during adult T cell leukemia/lymphoma therapy. **Investigational New Drugs**, v. 39, p. 317–329, 2021. DOI: 10.1007/s10637-020-01007-z.
- JÄGER, A. V. *et al.* The inflammatory response induced by *Pseudomonas aeruginosa* in macrophages enhances apoptotic cell removal. **Scientific Reports**, v. 11, art. 2393, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-81557-1.
- JAIN, V. *et al.* Phagocytosis and intracellular killing of MD-2 opsonized Gram-negative bacteria depend on TLR4 signaling. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4637–4645, 2008. DOI: 10.1182/blood-2007-11-126862.
- JIANG, L.; WANG, P.; SUN, Y.-J.; ... YU-J. *et al.* Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF- κ B pathway. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, p. 265, 2019. DOI: 10.1186/s13046-019-1251-7.
- JOHNSON-ARBOR, K. Ivermectin: a mini-review. **Clinical Toxicology**, v. 60, n. 5, p. 571–575, 2022. DOI: 10.1080/15563650.2022.2043338.
- KAGEYAMA, T. *et al.* Physiological and immunological barriers in the lung. **Seminars in Immunopathology**, v. 45, n. 4-6, p. 533-547, 2024. DOI: 10.1007/s00281-024-01003-y.
- KANELLOPOULOS, J. M. *et al.* Structural and functional features of the P2X4 receptor: an immunological perspective. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.645834.
- KAUR, B.; BLAVO, C.; PARMAR, M. S. Ivermectin: a multifaceted drug with a potential beyond anti-parasitic therapy. **Cureus**, v. 16, n. 3, e56025, 12 mar. 2024. DOI: 10.7759/cureus.56025.
- KAUR, H. *et al.* Ivermectin as a potential drug for treatment of COVID-19: an in-sync review with clinical and computational attributes. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 3, p. 736-749, 2021. DOI: 10.1007/s43440-020-00195-y

- KENNEDY, M. N. *et al.* A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide activates epithelial and TLR4+/MD-2-dependent cells through inflammatory signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 35671–35678, 2004. DOI: 10.1074/jbc. S0021-9258(20)77304-7.
- KHAKH, B. S. *et al.* Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 17, p. 7289–7299, 1999. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-17-07289.1999.
- KIM, H.-J. *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging. **Immunity & Ageing**, v. 20, art. 67, 2023. DOI: 10.1186/s12979-023-00383-3.
- KLOCKGETHER, J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, art. 150, 13 jul. 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00150.
- KLOTZ, U.; OGBUOKIRI, J. E.; OKONKWO, P. O. Ivermectin binds avidly to plasma proteins. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 607–608, 1990. DOI: 10.1007/BF00316107.
- KOH, A. Y. *et al.* Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5300–5310, 2009. DOI: 10.1128/IAI.00501-09.
- LACERDA, A. C. R. *et al.* Paraquat (PQ)-induced pulmonary fibrosis increases exercise metabolic cost, reducing aerobic performance in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 6, p. 671–679, 2009. DOI: 10.2131/jts.34.671.
- LAMONT, I. L. *et al.* Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 7072–7077, 12 maio 2002. DOI: 10.1073/pnas.092016999.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple ligand–protein interaction diaGrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 2011. DOI: 10.1021/ci200227u.
- LEE, J.-Y.; KO, K. S. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 2, p. 168–172, 2012. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.04.004.
- LIAO, C. *et al.* Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, art. 926758, 6 jul. 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.926758.
- LIN, C. K.; KAZMIERCZAK, B. I. Inflammation: a double-edged sword in the response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Journal of Innate Immunity**, v. 9, n. 3, p. 250–261, 2017. DOI: 10.1159/000455857.

LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582–610, 2009. DOI: 10.1128/CMR.00040-09.

LIU, J. *et al.* Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 179–188, 2011. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00764.x.

LIU, L. *et al.* Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- κ B and MAPK pathways. **BMC Immunology**, v. 21, art. 32, 2020. DOI: 10.1186/s12865-020-00355-y.

Liu, Z. *et al.* Deficiency of purinergic P2X4 receptor alleviates experimental autoimmune hepatitis in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 221, p. 116033, 2024. DOI: 10.1016/j.bcp.2024.116033.

LORENZ, A. *et al.* Importance of flagella in acute and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 883–897, mar. 2019. DOI: 10.1111/1462-2920.14468.

MA, L. Z. *et al.* Regulation of biofilm exopolysaccharide biosynthesis and degradation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Annual Review of Microbiology**, v. 76, p. 413–433, 2022. DOI: 10.1146/annurev-micro-041320-111355.

MA, Y. *et al.* Ivermectin contributes to attenuating the severity of acute lung injury in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 155, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113706.

MALHOTRA, S. *et al.* Mixed communities of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* exhibit enhanced resistance to host antimicrobials. **mBio**, v. 9, e00275-18, 2018. DOI: 10.1128/mbio.00275-18.

Martin, R. J. *et al.* Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. **Trends in Parasitology**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 48–64, 2021. DOI: 10.1016/j.pt.2020.10.005.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NF κ B system. **WIREs Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 227–241, 2016. DOI: 10.1002/wsbm.1331.

MOHAN, A. *et al.* Single-dose oral ivermectin in mild and moderate COVID-19 (RIVET- COV): A single-center randomized, placebo-controlled trial. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 27, n. 12, p. 1743-1749, 2021. DOI: 10.1016/j.jiac.2021.08.021

MORGAN, H. *et al.* Unravelling the immunomodulatory effects of ivermectin on human peripheral blood mononuclear cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1462, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01462.

MOSER, C. *et al.* Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. **Frontiers in Immunology**, v. 12, art. 625597, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.625597.

MUCH, R. M. *et al.* Mechanisms of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 17, n. 2, p. 143–152, 2018. DOI: 10.1016/j.jcf.2017.08.012.

MUGGEO, A. *et al.* Current concepts on *Pseudomonas aeruginosa* interaction with human airway epithelium. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 3, e1011221, 30 mar. 2023. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011221.

MUKHERJEE, S. *et al.* The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 7, e1006504, 17 jul. 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006504.

MUNTAKA, S. *et al.* Gamma interferon and interleukin-17A differentially influence the response of human macrophages and neutrophils to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 2, e00814-18, 2019. DOI: 10.1128/IAI.00814-18.

NAGAI, Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. **Nature Immunology**, v. 3, p. 667–672, 2002. DOI: 10.1038/ni809.

NICKERSON, R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung disease: untangling the dysregulated host immune response. **Frontiers in Immunology**, v. 15, art. 1405376, 28 jun. 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1405376.

NOORI, T.; SUREDA, A.; SHIROOIE, S. Ivermectin decreases inflammation and imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in rat via targeting TLR4/p65 NF- κ B. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 808-814, 2025. DOI: 10.22038/ijbms.2025.83254.18008.

NOVAES, R. D. *et al.* Acute paraquat exposure determines dose-dependent oxidative injury of multiple organs and metabolic dysfunction in rats: impact on exercise tolerance. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 2, p. 114–124, 2016. DOI: 10.1111/iep.12183.

NOVAES, R. D. *et al.* Parasite control and skeletal myositis in *Trypanosoma cruzi*-infected and exercised rats: effect of aerobic training on parasitism, inflammation and oxidative tissue damage. **Acta Tropica**, v. 168, p. 102–110, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.02.012.

O'BOYLE, N. M. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, art. 33, 2011. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research, and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. Genebra, 2017. Disponível em: file:///C:/Users/Thiago/Downloads/WHO-EMP-IAU-2017.12-eng%20(2).pdf. Acesso em: 20 jan.2022.

PÅLSSON-McDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 153–162, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x.

PEREIRA, M. *et al.* The IRAK4 scaffold integrates TLR4-driven TRIF and MYD88 signaling pathways. **Cell Reports**, v. 40, n. 7, art. 111225, 2022. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111225.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, art. 65, 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00065.

PRASAD, A. S. B. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* virulence proteins pseudolysin and protease IV impede cutaneous wound healing. **Laboratory Investigation**, v. 100, n. 12, p. 1532–1550, dez. 2020. DOI: 10.1016/j.labinvest.2020.00478.

QIN, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, art. 199, 25 jun. 2022. DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1.

RAMPHAL, R. *et al.* TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3927–3934, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.6.3927.

RAOUST, E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, e7259, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007259.

RENDIC, S. Metabolism and interactions of Ivermectin with human cytochrome P450 enzymes and drug transporters, possible adverse and toxic effects. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 5, p. 1535–1546, 2021. DOI: 10.1007/s00204-021-03025-z.

RIZAKOS, T.; GEDDES-MCALISTER, J. Remodeling of the neutrophil proteome upon exposure to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbiology Resource Announcements**, v. 14, n. 4, e01147-24, 2025. DOI: 10.1128/mra.01147-24.

ROSA, C. P. *et al.* Vancomycin-induced gut dysbiosis during *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection in a mice model. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 107, n. 1, p. 95–104, 2020. DOI: 10.1002/JLB.4AB0919-432R.

ROUILLARD, K. R. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm eradication via nitric oxide-releasing cyclodextrins. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1940–1950, 2020. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00246.

SAHU, A.; RUHAL, R. Immune system dynamics in response to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 11, art. 104, 2025. DOI: 10.1038/s41522-025-00738-2.

SAJID, M. S. *et al.* Effect of ivermectin on the cellular and humoral immune responses of rabbits. **Life Sciences**, v. 80, p. 1966-1970, 2007. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.025.

SALIBA, A. S. M. C. *et al.* Bee pollen from bracatinga (*Mimosa scabrella*): Effects of gastrointestinal digestion and epithelial transport *in vitro* on phenolic profile and bioactivities. **Food Research International**, v. 196, 115142, nov. 2024. DOI: 10.1016/j.foodres.2024.115142.

SANTANA, A. B. *et al.* Murine response to the opportunistic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* infection in gut dysbiosis caused by 5-fluorouracil chemotherapy-induced mucositis. **Life Sciences**, v. 307, 120890, 2022. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120890.

SANTOS, J. D. B. *et al.* Food-drug interaction: anabolic steroids aggravate hepatic lipotoxicity and nonalcoholic fatty liver disease induced by trans fatty acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 116, p. 360–368, 2018. DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.056.

SANTOS, M. P. *et al.* Doxycycline aggravates granulomatous inflammation and lung microstructural remodeling induced by *Schistosoma mansoni* infection. **International Immunopharmacology**, v. 94, 2021. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107462.

SARANDY, M. M. *et al.* Hydroethanolic extract of *Strychnos pseudoquina* accelerates skin wound healing by modulating the oxidative status and microstructural reorganization of scar tissue in experimental type I diabetes. **BioMed Research International**, 2017, 9538351, 2017. DOI: 10.1155/2017/9538351.

SARANDY, M. M. *et al.* *Strychnos pseudoquina* modulates the morphological reorganization of the scar tissue of second intention cutaneous wounds in rats. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, e0195786, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195786.

SARKAR, S. Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 6549–6564, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10687-9.

SAWA, T. *et al.* Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. **Critical Care**, v. 18, art. 668, 2014. DOI: 10.1186/s13054-014-0668-9.

SCHMITH, V. D.; ZHOU, J. J.; LOHMER, L. R. L. The approved dose of ivermectin alone is not the ideal dose for the treatment of COVID-19. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 108, n. 4, p. 762-765, out. 2020. DOI: 10.1002/cpt.1889.

SHAIKH, M. O. F. *et al.* Multicomponent *Pseudomonas aeruginosa* vaccines eliciting Th17 cells and functional antibody responses confer enhanced protection against experimental acute pneumonia in mice. **Infection and Immunity**, v. 90, n. 10, e00203-22, 2022. DOI: 10.1128/iai.00203-22.

SHIMAZU, R. *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 11, p. 1777–1782, 1999. DOI: 10.1084/jem.189.11.1777.

SHINDO, Y. *et al.* Interleukin 7 immunotherapy improves host immunity and survival in a two-hit model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 2, p. 543–554, 2017. DOI: 10.1189/jlb.4A1215-581R.

SINDELDECKER, D.; STOODLEY, P. The many antibiotic resistance and tolerance strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofilm**, v. 3, art. 100056, 2021. DOI: 10.1016/j.biofilm.2021.100056.

SINGH, M. P. *et al.* Repurposing ivermectin for treatment of viral infections: mechanisms, pharmacokinetics and therapeutic strategies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 914886, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.914886.

SKOPELJA-GARDNER, S. *et al.* Regulation of *Pseudomonas aeruginosa*-mediated neutrophil extracellular traps. **Frontiers in Immunology**, v. 10, art. 1670, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01670.

SLUYTER, R. *et al.* Methods for studying P2X4 receptor ion channels in immune cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 526, p. 113626, 2024. DOI: 10.1016/j.jim.2024.113626.

SOARES, A.; ALEXANDRE, K.; ETIENNE, M. Tolerance and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms exposed to antibiotics: molecular mechanisms, antibiotic strategies and therapeutic perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, art. 2057, 27 ago. 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.02057.

STOVER, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 959–964, 2000. DOI: 10.1038/35023079.

SU, Q. *et al.* Effects of the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway on NLRP3 inflammasome in coronary microembolization-induced myocardial injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 1497–1508, 2018. DOI: 10.1159/000490866.

SUDA, Y. *et al.* Macrophage activation in response to S-form lipopolysaccharides (LPS) separated by centrifugal partition chromatography from wild-type LPS: effects of the O-polysaccharide portion of LPS. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 210, n. 3, p. 871–877, 1995. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1713.

SUN, J. *et al.* Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276–284, 2003. DOI: 10.3390/s30800276.

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

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, art. 8671, 2020. DOI: 10.3390/ijms21228671.

TOBIAS, P. S. *et al.* Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 7, n. 3, p. 239–245, 1992. DOI: 10.1165/ajrcmb/7.3.239.

TROTT, O. *et al.* AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010. DOI: 10.1002/jcc.21334.

TSAI, Y.-K. *et al.* Effects of different mechanisms on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a strategic system for evaluating antibiotics against Gram-negative bacteria. **Microbiology Spectrum**, v. 13, n. 4, e02418-24, 2025. DOI: 10.1128/spectrum.02418-24.

TUKHVATULIN, A. I. *et al.* Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF- κ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3855–3864, 2013. DOI: 10.1128/IAI.00525-13.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: development and tissue specialization. **Annual Review of Immunology**, v. 33, p. 643-675, 2015. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.

VERDIAL, C. *et al.* Mechanisms of antibiotic and biocide resistance that contribute to *Pseudomonas aeruginosa* persistence in the hospital environment. **Biomedicines**, v. 11, n. 4, art. 1221, 19 abr. 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11041221.

VISINTIN, A. *et al.* Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 24793–24799, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M302041200.

VISINTIN, A. *et al.* Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 12156–12161, 2001. DOI: 10.1073/pnas.211445098.

WAGSTAFF, K. M. *et al.* Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. **The Biochemical Journal**, v. 443, n. 3, p. 851-856, 2012. DOI: 10.1042/BJ20120150.

- WANG, Y. *et al.* Composition and function of neutrophil extracellular traps. **Biomolecules**, v. 14, art. 416, 2024. DOI: 10.3390/biom14040416.
- WANG, Y. *et al.* TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 7, p. E884-E893, 16 fev. 2016. DOI: 10.1073/pnas.1525639113.
- WHITE, A. T. *et al.* Controlled trial and dose-finding study of ivermectin for treatment of onchocerciasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 3, p. 463-470, 1987. DOI: 10.1093/infdis/156.3.463.
- WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. **Respirology**, v. 15, n. 7, p. 1037–1056, 2010. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2010.01819.x
- WILSON, N. E.; REAVES, B. J.; WOLSTENHOLME, A. J. Lack of detectable short-term effects of a single dose of ivermectin on the human immune system. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 304, 05 jun. 2021. DOI: 10.1186/s13071-021-04810-6.
- WOLSTENHOLME, A. J.; ROGERS, A. T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. **Parasitology**, Cambridge, v. 131, supl. S85-S95, 2005. DOI: 10.1017/S0031182005008218.
- WOOD, S. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: infections, animal modeling, and therapeutics. **Cells**, v. 12, n. 1, art. 199, 3 jan. 2023. DOI: 10.3390/cells12010199.
- WULAN, W. N. *et al.* Nucleocytoplasmic transport of nucleocapsid proteins of enveloped RNA viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 335, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00553.
- XIE, Y. *et al.* Ivermectin protects against experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by modulating the Th17/Treg balance involved in the IL-2/STAT5 pathway. **Inflammation**, v. 46, n. 5, p. 1626–1638, 2023. DOI: 10.1007/s10753-023-01829-y.
- YANG, S. N. Y. *et al.* The broad spectrum antiviral ivermectin targets the host nuclear transport importin α/β 1 heterodimer. **Antiviral Research**, v. 177, p. 104760, 2020. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104760.
- YE, L.; JIANG, Y.; ZHANG, M. Crosstalk between glucose metabolism, lactate production and immune response modulation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 68, p. 81–92, 2022. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2022.11.001.
- ZHANG, K. *et al.* Regulation of LPS-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells via TLR4-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways by lactoferrin. **Life (Basel)**, v. 15, n. 1, art. 69, 2025. DOI: 10.3390/life15010069.
- ZHANG, X. *et al.* A comprehensive review of the pathogenic mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*: synergistic effects of virulence factors, quorum sensing,

and biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, art. 1619626, 21 jul. 2025. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1619626.

ZHANG, X. *et al.* Inhibitory effects of ivermectin on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 354–359, 2009. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.12.016.

Zhang, X. *et al.* Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice. **Inflammation Research**, v. 57, p. 524–529, 2008. DOI: 10.1007/s00011-008-8007-8.

Zhong, P. *et al.* P2X4 receptor modulates gut inflammation and favours microbial homeostasis in colitis. **Clinical and Translational Medicine**, v. 13, n. 4, e1227, 2023. DOI: 10.1002/ctm2.1227.

ZHOU, C. *et al.* Benzoylaconine modulates LPS-induced responses through inhibition of toll-like receptor-mediated NF- κ B and MAPK signaling in RAW264.7 cells. **Inflammation**, v. 44, n. 5, p. 2018–2032, 2021. DOI: 10.1007/s10753-021-01478-z.

ZHOU, Y. *et al.* Validation of secretory Immunoglobulin A (IgA) for early and efficient diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand)**, v. 69, n. 7, p. 35–39, 2023. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.7.6.

ZOU, J.; SHANKAR, N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF- κ B signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine expression in response to *E. faecalis* infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, e0136947, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0136947.

7.0 APÊNDICE A – ARTIGO DESTA TESE DE DOUTORADO

Molecular and Cellular Biochemistry
<https://doi.org/10.1007/s11010-025-05419-4>



Ivermectin modulates macrophage activity and enhances bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia

Thiago Caetano Andrade Belo¹ · Natália Cristina de Melo Santos¹ · Leonardo Pereira de Araújo¹ · Ana Sofia Martelli Chaib Saliba² · Severino Matias de Alencar² · Graziela Domingues de Almeida Lima³ · Rômulo Dias Novaes³ · Flávio Protásio Veras⁴ · Giovane Galdino de Souza⁴ · Patrícia Paiva Corsetti¹ · Leonardo Augusto de Almeida¹

Received: 9 July 2025 / Accepted: 12 October 2025
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2025

Abstract

The TLR4 receptor, together with the MD-2 co-receptor, is essential for macrophage recognition of LPS from Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*. Although ivermectin improves survival following LPS challenge in mice, its immunological mechanisms remain poorly understood. In silico molecular docking was performed to evaluate the binding of ivermectin to TLR4/MD-2. In vitro studies were conducted using RAW 264.7 macrophages and bone marrow-derived macrophages (BMDMs) treated with ivermectin and/or TLR4/MD-2 inhibitors, followed by LPS stimulation or infection with *P. aeruginosa* PA14. In vivo studies were carried out in C57BL/6 wild-type (WT) and TLR4 knockout (KO) mice treated with ivermectin or phosphate-buffered saline and subsequently intratracheally infected with PA14. Docking analysis demonstrated high-affinity binding of ivermectin to the MD-2 component of the TLR4/MD-2 complex. Ivermectin did not affect macrophage viability but impaired bacterial clearance, reduced NO and TNF- α secretion, and enhanced NF- κ B activation in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. These effects were reversed by TLR4/MD-2 complex inhibition with LPS/RS. In vivo, ivermectin treatment reduced the pulmonary bacterial load in TLR4 KO mice. Additionally, ivermectin decreased inflammatory infiltrates IL-6 and TNF- α levels while increasing IL-17 and IFN- γ production in infected lungs, with more pronounced effects in TLR4 KO mice. Ivermectin binds to MD-2 and suppresses macrophage microbicidal activity in vitro. In vivo, however—particularly in TLR4-deficient mice—ivermectin improved bacterial clearance, lung histopathology, and cytokine modulation. These findings highlight a complex, context-dependent immunomodulatory role of ivermectin.

Graphical Abstract

In silico, ivermectin binds to the MD-2 component of the TLR4/MD-2 complex, modulating NF- κ B signaling in macrophages. In vitro, ivermectin impairs bacterial clearance, increases recovery of viable bacteria, and decreases TNF- α and

✉ Leonardo Augusto de Almeida
leonardo.almeida@unifal-mg.edu.br

- ¹ Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms, Federal University of Alfenas (UNIFAL), Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, Minas Gerais 37130-001, Brazil
- ² Department of Agri-Food Industry, Food, and Nutrition, 'Luiz de Queiroz' College of Agriculture, University of São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brazil
- ³ Department of Structural Biology, Federal University of Alfenas (UNIFAL), Alfenas, Minas Gerais, Brazil
- ⁴ Laboratory of Neuroimmunobiology of Pain, Federal University of Alfenas, Alfenas 37130-001, Brazil