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

MOUZARLLEM BARROS DOS REIS

**Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela
peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***

Ribeirão Preto

2019

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

Mouzarlem Barros dos Reis

**Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela
peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena
Faccioli

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Mouzarllem Barros dos

Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*.
100 fls.: il. 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. *Tityus serrulatus*; 2. PGE₂; 3. Acetilcolina; 4. Disfunção cardíaca

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mouzarllem Barros dos Reis

Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela
peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena

Faccioli

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Processos nº 2017/02314-3 (BB-DR); 2014/07125-6 (AP-TEM); 2015/00658-1 (EMU);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP);
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP)
- Instituto Butantan.

DEDICATÓRIA

Este trabalho, assim como minha dissertação, continua sendo dedicado a todos os meus professores desde o jardim de infância até o doutorado.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente gostaria de agradecer a mim, por acreditar em mim, por ter desenvolvido este trabalho interdisciplinar tão complexo, por trabalhar duro sem muitas folgas, e por nunca desistir.
- Agradeço também minha família por sempre ser meu porto seguro, em especial meu pai João, minha mãe Ayala e minha irmã Ariadylla.
- Gostaria de agradecer a minha orientadora e amiga, Profa Lúcia Faccioli, não só por me ensinar ciência, mais também por me passar ensinamentos sobre a vida que, esses sim, valem MUITO mais que todo meu aprendizado sobre ciência e imunologia. Quando nos conhecemos, você me disse por e-mail: “espero que nossa colaboração seja produtiva”. Tenho certeza que os 5 anos juntos valeram para crescimento pessoal e profissional! E como você mesma diz, seremos sempre seus alunos, nunca ex! Também de agradecer à Prof. Fabiani Frantz pela amizade, discussões e suporte em minha carreira acadêmica.
- Três pilares fundamentais para minha alegria: Atlante, Jeimison e Ivaldo. Se algum dia vocês tiverem amizade como a nossa, então a vida de vocês valeu a pena..... vocês três são o mais perto de “gostar de alguém” que eu já tive na vida.
- Às minhas amigas e irmãs Ana e Denise. Foram muitas histórias, conflitos, alegrias, tristezas... A vida tem dessas de colocar as pessoas certas nos momentos certos. Obrigado por acompanharem e torcerem e me ajudarem em cada etapa do meu crescimento.

- Agradeço também às técnicas Alyne e Carol pelas risadas, amizade, e por tornar o ambiente de trabalho menos estressante e mais feliz.

- A todos os colegas de laboratório que contribuíram de maneira direta ou indireta para realização desse trabalho: Karina, Carlos, Camila, Jeff e Fabi. Um agradecimento especial ao Gustavo Gardinassi que, após inúmeros experimentos, tornou a tese “palatável” e organizada, me ajudando a contar uma história com meus resultados.

- Aos colaboradores deste estudo, que são muitos. Fazer um trabalho interdisciplinar exige colaboração, e do qual nascerão lindas amizades: Nath e Fernanda, muito obrigado por tudo. Sem vocês metade dessa tese nem existiria. Agradeço também ao suporte técnico do Beto por toda ajuda, assim como da Prof. Simone Gusmão Ramos e sua equipe técnica.

- Aos amigos mais que especiais que a pós-graduação me deu, que na verdade se tornaram irmãos que dividem alegrias e angústias, e sempre torcemos um pelo outro: Bruno Marcel e Bruna Bertol.

- A todos os amigos e colegas que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*Não tenho necessidade de ser reconhecido
para saber que sou alguém – Sigmund
Freud (1884)*

RESUMO

REIS, M.B. **Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. 2019. 100 fls. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O envenenamento por *Tityus serrulatus* induz sintomas locais ou sistêmicos, como dor intensa e inflamação. No envenenamento severo, reações sistêmicas culminam em edema agudo de pulmão e choque cardiogênico, que potencialmente pode levar à morte. Nosso grupo demonstrou que os receptores de reconhecimento padrão, como TLR2 e TLR4 em macrófagos, reconhecem a peçonha de *T. serrulatus* (TsV) resultando na produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e eicosanoides. Além disso, a inoculação de camundongos com TsV induz edema pulmonar e morte mediados pela ativação do inflamassoma NLRP3 e liberação de IL-1 β , por um processo regulado por mediadores lipídicos. No entanto, os mecanismos responsáveis pelas manifestações cardíacas durante o escorpionismo são pouco conhecidos. Assim, neste projeto, empregando animais selvagens (C57Bl/6 ou WT) ou deficientes do receptor para IL-1 β (*Il1r1^{-/-}*) inoculados com dose letal de TsV (180 μ g.kg⁻¹), avaliamos a função cardíaca, por meio da técnica de ecocardiograma e canulação da carótida, e determinamos a pressão arterial, função cardíaca, a produção de mediadores inflamatórios no tecido cardíaco e a liberação de neurotransmissores sistemicamente. Observamos que ocorre aumento da produção de IL-1 β e PGE₂ no tecido cardíaco somente em camundongos C57Bl/6, e que a sinalização mediada por IL-1 β é essencial para as alterações da frequência cardíaca e a da pressão arterial, uma vez que em camundongos *Il1r1^{-/-}* ou animais WT tratados com dexametasona não ocorre queda na pressão arterial, batimentos cardíacos e nem alterações no ecocardiograma, além de sobreviverem ao envenenamento. Além disso, demonstramos que sinalização dependente do receptor IL-1R é essencial para a produção de PGE₂, que por sua vez, via receptores EP2/EP4, controla a liberação de acetilcolina, mas não de adrenalina ou noradrenalina. Além disso, determinamos que fibroblastos cardíacos, mas não os cardiomiócitos, produzem IL-1 β após estimulação com o veneno *in vitro*. Esses dados comprovam que no envenenamento por escorpião, ocorre ativação do eixo IL-1 β /IL-1R/PGE₂/EP2-EP4/ACh responsável pela liberação de acetilcolina que leva à disfunção cardíaca e mortalidade. Com base nos nossos resultados, estamos propondo que além da administração do soro antiescorpiônico, seja feita terapia adicional com alta dose de corticoide logo após a picada pelo escorpião, para prevenir a liberação dos mediadores inflamatórios e de acetilcolina, e assim minimizar o risco de morte no escorpionismo.

PALAVRAS-CHAVE: *Tityus serrulatus*, PGE₂, acetilcolina, disfunção cardíaca, inflamação, ativação neuroimune.

ABSTRACT

REIS, M.B. **Investigation of cardiac alterations that occur in poisoning by *Tityus serrulatus* scorpion venom.** 2019. 100 fls. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Tityus serrulatus envenomation induces local or systemic symptoms such as severe pain and inflammation. In severe manifestations, systemic reaction culminates in acute lung edema and cardiogenic shock, which can potentially lead to death. Our group demonstrated that pattern recognition receptors such as TLR2 and TLR4 in macrophages recognize *T. serrulatus* (TsV) venom resulting in the production of pro-inflammatory mediators such as cytokines and eicosanoids. In addition, mouse inoculation with TsV induces pulmonary edema and death mediated by activation of the NLRP3 inflammasome and IL-1 β release by a process regulated by lipid mediators. However, the mechanisms responsible for cardiac manifestations during scorpionism are poorly understood. Thus, in this project employing wild-type animals (C57Bl / 6 or WT) or IL-1 β receptor-deficient animals (*Il1r1*^{-/-}) inoculated with a lethal dose of TsV (180 μ g.kg⁻¹), we evaluated cardiac function by echocardiogram and carotid cannulation technique, and we determined blood pressure, the production of inflammatory mediators in heart tissue and neurotransmitters release systemically. We observed that IL-1 β and PGE₂ production increased in cardiac tissue only in C57Bl/6 mice, and that IL-1 β -mediated signaling is essential for changes in heart rate and blood pressure. *Il1r1*^{-/-} or dexamethasone-treated WT animals do not experience a drop in blood pressure, heartbeat or echocardiographic changes, as well as in survival rate. In addition, we have shown that IL-1R receptor-dependent signaling is essential for PGE₂ production, which in turn, via EP2/EP4 receptors, controls the release of acetylcholine, but not adrenaline or noradrenaline. In addition, we determined that cardiac fibroblasts, but not cardiomyocytes, produce IL-1 β after venom stimulation *in vitro*. These data show that scorpion poisoning activates the IL-1 β /IL-1R/PGE₂/ACh axis and is responsible for acetylcholine release leading to cardiac dysfunction and mortality. Based on our results, we are proposing that in addition to the administration of anti-scorpion serum, additional high-dose corticosteroid therapy should be given soon after scorpion bite to prevent the release of inflammatory mediators and acetylcholine, thereby minimizing the risk of death in scorpionism.

KEYWORDS: *Tityus serrulatus*, PGE₂, acetylcholine, cardiac dysfunction, inflammation, neuroimmune activation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos de escorpionismo no Brasil por regiões e unidades federativas de 2000 a 2017	19
Figura 2: Principais componentes da peçonha do escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	20
Figura 3. Ativação de macrófagos por TsV	25
Figura 4. PGE ₂ e IL-1 β em tecido cardíaco após o envenenamento	45
Figura 5. Alterações sistêmicas induzidas pelo veneno de escorpião em camundongos	47
Figura 6. Pressão arterial e batimentos cardíacos em camundongos letalmente envenenados com peçonha do escorpião amarelo	49
Figura 7. Peçonha de <i>T. serrulatus</i> induz inflamação no tecido cardíaco e aumento de PGE ₂ sistemicamente	51
Figura 8. Mediadores inflamatórios liberados por CFs e CMs estimulados com TsV.....	53
Figura 9. Aumento de PRRs e expressão gênica de componentes inflamatórios em fibroblastos cardíacos (CFs) após estimulação com TsV	55
Figura 10. Produção de IL-1 β por fibroblastos cardíacos é dependente do eixo PGE ₂ /EP2/cAMP/PKA/NF- κ B.....	57
Figura 11. Esquema de ativação de CFs pelo TsV	58
Figura 12. Pressão arterial (PA) e batimentos cardíacos (BP) de animais C57Bl/6 tratados ou não com dexametasona e <i>Il1r1</i> ^{-/-} letalmente envenenados.....	60
Figura 13. O tratamento com dexametasona ou a ausência do receptor IL-1R preservam as funções cardíacas no envenenamento severo	62
Figura 14. O tratamento com dexametasona ou a ausência do receptor IL-1R previnem a mortalidade e as manifestações sistêmicas observadas no envenenamento severo	64
Figura 15. A sinalização de IL-1 β /IL-1R induz tumefação mitocondrial em cardiomiócitos de camundongos envenenados	65
Figura 16. O envenenamento induz aumento de catecolaminas circulantes	67
Figura 17. O aumento de acetilcolina circulante tem impacto na sobrevida e sintomas clínicos no envenenamento	68
Figura 18. A atropina reverte as alterações cardíacas induzidas pelo TsV.....	69
Figura 19. O eixo IL-1 β /IL-1R/PGE ₂ regula a liberação de ACh circulante no envenenamento	71
Figura 20. PGE ₂ induz liberação de ACh via receptor EP2/EP4	73
Figura 21. PGE ₂ não inibe atividade da acetilcolinesterase (AChE)	74
Figura 22. Figura esquemática final	75
Figura 23. Estratégia de <i>gate</i> para citometria de fluxo	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA** – Ácido araquidônico
- ACh** – Acetilcolina
- AChE** – Acetilcolinesterase
- BLT1** – LTB₄ receptor 1
- BSA** – Albumina de soro bovino
- cAMP** - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- CD14** – *Clustter of differentiation 14*
- CD36** - *Clustter of differentiation 36*
- cDNA** – *Complementary DNA*
- CF** – Fibroblastos cardíacos
- CK-MB** – Creatinoquinase MB
- CM** - Cardiomiócito
- DAMP** – Padrões moleculares associados à danos
- DC** – Débito Cardíaco
- DEX** – Dexametasona
- FE** – Fração de ejeção
- GM-CSF** – Fator estimulador de colônia – granulócito/monócito
- IFN-γ** – Interferon- alpha
- IL-1α** – Interleucina-1alpha
- IL-1β** – Interleucina-1beta
- IL-6** – Interleucina 6
- IL-8** – Interleucina 8
- IL-10** – Interleucina 10
- IL-1R** – receptor de Interleucina 1
- Indo** – Indometacina
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- LTB₄** – Leucotrieno B₄

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NLRP3 - Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD

NO – Óxido nítrico

PAMP – Padrões moleculares associados à patógenos

PBMC – células mononucleares do sangue periférico

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PKA – Proteína quinase A

PPAR- γ - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama

PRR – Receptores de reconhecimento padrão

SC – Sistema complemento

TLR2 – *Toll-like receptor 2*

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha

TsV – *T. serrulatus venom*

VAMP – Padrões moleculares associados a venenos

VS – Volume sistólico

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de abreviaturas e siglas	iv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Aspectos gerais do escorpionismo.....	18
1.2 Resposta imune induzida pela peçonha do <i>T. serrulatus</i>	22
1.3 Alterações cardíacas induzidas pelo envenenamento: Achados e perspectivas.....	28
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Obtenção da peçonha do escorpião <i>Tityus serrulatus</i> (TsV).....	34
3.2 Animais.....	34
3.3 Cultura primária de células cardíacas e tratamentos farmacológicos <i>in vitro</i>	35
3.4 Experimentos <i>in vivo</i>	36
3.5 Tratamentos farmacológicos <i>in vivo</i>	37
3.6 Citometria de fluxo	38
3.7 Análise da expressão gênica por qRT-PCR	39
3.8 Western blot	40
3.9 Quantificação de cAMP intracelular	40
3.10 Quantificação de IL-1 β , PGE ₂ , acetilcolina e catecolaminas.....	41
3.11 Microscopia eletrônica.....	42
3.12 Análise Estatística	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1 Curva tempo-resposta da produção de PGE ₂ e IL-1 β pelo tecido cardíaco após envenenamento com dose letal da peçonha de <i>T. serrulatus</i>	44
4.2 Parâmetros utilizados para avaliação da severidade do envenenamento.....	46
4.3 Avaliação dos batimentos cardíacos e pressão arterial após o envenenamento	48
4.4 A peçonha do escorpião <i>T. serrulatus</i> induz inflamação no tecido cardíaco.....	50
4.5 Fibroblastos cardíacos (CFs), mas não cardiomiócitos, são responsáveis pela produção de IL-1 β no coração após estimulação com TsV.....	52

4.6 Fibroblastos cardíacos (CFs) estimulados com TsV tem regulação positiva de genes inflamatórios e aumento da expressão de receptores de reconhecimento padrão (PRRs)	54
4.7 Fibroblastos cardíacos (CFs) produzem IL-1 β via ativação do eixo PGE ₂ /EP2/cAMP/PKA/NF- κ B.....	56
4.8 A ausência do receptor IL-1R ou o tratamento com dexametasona revertem a bradicardia e a diminuição da pressão arterial no envenenamento severo.....	59
4.9 A ausência do receptor IL-1R ou o tratamento com dexametasona preservam as funções cardíacas de animais envenenados com TsV.....	61
4.10 A ausência do receptor IL-1R ou o tratamento com dexametasona previnem as manifestações sistêmicas e morte no envenenamento	63
4.11 O sistema autônomo parassimpático, mas não o simpático, tem relevância na promoção das manifestações clínicas e mortalidade no envenenamento	66
4.12 O tratamento com atropina reverte as alterações cardíacas no envenenamento.....	69
4.13 O eixo IL-1R/PGE ₂ regula o aumento de ACh	70
4.14 A administração de PGE ₂ em animais <i>Il1r1^{-/-}</i> ou a administração de inibidor de PGE ₂ -sintase em C57Bl/6 modula a liberação de ACh	72
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS	93
Anexo I – Estratégias de <i>gate</i> utilizadas nos experimentos de citometria de fluxo ...	94
Anexo II – Comitê de Ética no Uso de Animais da FCFRP-USP.....	95
Anexo III – Comitê de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP	96
Anexo IV – Certidão de cadastro de patrimônio genético no SISGEN	97
Anexo V – Artigos publicados durante o doutorado	98

1. Introdução

**Aspectos gerais do escorpionismo, resposta imune e alterações
cardíacas induzidas pelo envenenamento**

1.1 Aspectos gerais do escorpionismo

Os escorpiões são artrópodes pertencentes à classe *Arachnida* e constituem um importante problema de saúde pública ao redor do mundo. Existem cerca de 2000 espécies de escorpião catalogadas, e destas, em torno de 30 são de importância médica, especialmente aquelas pertencentes à família *Buthidae* (PUCCA et al., 2015a). O gênero *Tityus* constitui o grupo de espécies com maior incidência no Brasil, em especial a espécie *Tityus serrulatus*, originária do estado de Minas Gerais e que hoje já possui casos por todos os estados da região Sul e Sudeste (RECKZIEGEL; LAERTE; JR, 2014; PUCCA et al., 2015a).

A biologia e ecologia do escorpião explicam o crescente aumento do número de casos desde 2000 quando os dados começaram a ser notificados (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O escorpião amarelo é adaptado aos centros urbanos onde o acúmulo de lixo e consequente disponibilidade de alimentos, como baratas, fazem com que os animais tenham as condições perfeitas para sua reprodução. Além disso, o *T. serrulatus* se reproduz por partenogênese, com cada indivíduo tendo até duas ninhadas de 20 animais cada por ano, tornado fácil a inserção desta espécie em ambiente até então não habitados por introdução passiva (COLOGNA et al., 2009; RECKZIEGEL; LAERTE; JR, 2014; PUCCA et al., 2015a). Ademais, estes animais são capazes de procriar mesmo após 200 dias de privação de comida (PIMENTA et al., 2019). A relevância desta espécie nos espaços urbanos brasileiros se explica pelo aumento do número de acidentes, ocorrendo principalmente nos meses de setembro a dezembro. Além disso, o aumento do número de casos só no estado de São Paulo de 2000 a 2017 foi de mais de 1000% (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

CASOS - ESCORPIONISMO	Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015*	2016*	2017*	TOTAL
	Região Norte	414	672	935	1.364	1.583	1.893	2.034	2.005	2.301	2.762	2.473	2.845	3.277	3.541	3.643	3.639	3.230	4.334	42.945
	Rondônia	31	54	63	131	162	187	141	79	68	90	102	96	175	175	151	215	150	256	2.326
	Acre	8	6	16	20	30	28	47	64	81	92	112	133	162	177	183	227	171	226	1.783
	Amazonas	9	20	41	85	119	166	188	125	191	267	204	226	343	382	389	330	278	372	3.735
	Roraima	1	14	19	12	18	13	24	33	36	45	48	46	81	63	81	80	105	138	857
	Pará	306	499	622	875	984	1.144	1.261	1.325	1.502	1.675	1.527	1.780	1.802	1.920	1.948	1.883	1.493	1.796	24.342
	Amapá	11	12	56	77	101	115	147	148	143	142	96	124	154	121	177	178	162	179	2.143
	Tocantins	48	67	118	164	169	240	226	231	280	451	384	440	560	703	714	726	871	1.367	7.759
	Região Nordeste	7.713	8.371	10.195	10.295	12.977	15.917	18.743	19.508	19.076	23.782	25.488	30.690	30.013	38.537	42.788	38.345	39.459	56.074	447.971
	Maranhão	19	33	63	86	88	127	156	142	136	236	267	420	357	744	682	649	842	1.387	6.434
	Piauí	122	197	180	259	203	304	316	274	388	582	519	701	841	1.846	1.608	1.370	1.821	2.429	13.960
	Ceará	8	270	363	340	619	866	563	674	464	719	1.103	2.283	2.358	3.393	3.297	2.861	3.891	4.256	28.328
	Rio Grande do Norte	1.317	1.248	1.254	1.104	1.224	1.407	1.509	1.260	1.421	2.209	2.380	2.920	3.008	3.299	3.711	3.879	3.737	4.334	41.221
	Paraíba	181	80	344	297	394	633	895	1.072	1.154	1.123	1.484	2.154	2.459	2.876	3.467	3.049	1.346	4.351	27.359
	Pernambuco	542	856	1.223	2.168	3.718	4.308	6.705	6.972	5.459	5.208	5.162	5.466	5.773	7.991	9.365	8.461	10.134	14.591	104.102
	Alagoas	2.527	2.070	2.349	2.088	2.301	2.223	2.576	2.996	3.508	3.798	4.814	5.467	5.463	6.826	7.922	6.843	7.286	9.028	80.085
	Sergipe	6	15	28	15	39	48	124	253	293	458	660	768	708	896	908	972	1.101	1.611	8.903
	Bahia	2.991	3.602	4.391	3.938	4.391	6.001	5.899	5.865	6.253	9.449	9.099	10.511	9.046	10.666	11.828	10.261	9.301	14.087	137.579
	Região Sudeste	3.771	7.814	9.957	11.165	13.405	15.579	14.135	13.771	16.433	21.288	21.272	22.891	25.873	30.893	34.521	37.950	41.981	54.488	397.187
	Minas Gerais	1.189	4.723	6.241	6.965	8.462	9.946	8.761	8.393	9.731	13.078	12.259	13.460	14.261	17.062	19.086	19.930	21.531	27.955	223.033
	Espírito Santo	200	206	288	348	732	981	745	764	1.122	1.445	1.529	2.013	2.138	2.212	2.771	2.511	2.660	4.770	27.435
	Rio de Janeiro	81	108	128	214	194	240	227	244	259	246	257	217	308	297	270	307	427	526	4.550
	São Paulo	2.301	2.777	3.300	3.638	4.017	4.412	4.402	4.370	5.321	6.519	7.227	7.201	9.166	11.322	12.394	15.202	17.363	21.237	142.169
	Região Sul	81	370	430	476	534	673	740	967	1.000	1.014	1.143	1.276	1.413	1.690	1.852	2.499	2.238	2.929	21.325
	Paraná	10	277	268	343	377	513	537	712	738	709	806	887	1.041	1.260	1.429	1.912	1.707	2.334	15.860
	Santa Catarina	59	82	124	104	107	108	145	187	198	195	210	221	210	216	205	290	287	304	3.252
	Rio Grande do Sul	12	11	38	29	50	52	58	68	64	110	127	168	162	214	218	297	244	291	2.213
	Região Centro-Oeste	573	717	824	846	1.223	1.333	1.313	1.119	1.477	1.984	2.133	2.440	3.586	3.702	4.223	3.986	4.568	6.252	42.299
	Mato Grosso do Sul	6	25	43	35	79	135	154	115	283	330	398	688	1.069	884	1.090	1.097	1.012	1.593	9.036
	Mato Grosso	15	83	122	126	261	274	302	368	425	555	597	624	801	879	617	670	667	717	8.103
	Goiás	336	417	545	527	726	796	737	512	595	883	851	767	1.285	1.450	1.981	1.689	2.013	2.983	19.093
	Distrito Federal	216	192	114	158	157	128	120	124	174	216	287	361	431	489	535	530	876	959	6.067
	Brasil	12.552	17.944	22.341	24.146	29.722	35.395	36.965	37.370	40.287	50.830	52.509	60.142	64.162	78.363	87.027	86.419	91.476	124.077	951.727
Data do Banco SINAN		19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	19/07/2012	27/12/2012	21/12/2012	29/08/2014	23/06/2015	28/06/2016	21/06/2018	22/06/2018	23/06/2018	24/06/2018	
*Dados sujeitos à revisão																				

Figura 1: Casos de escorpionismo no Brasil por regiões e unidades federativas de 2000 a 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Após a picada, a peçonha do *T. serrulatus* (TsV) se espalha rapidamente até atingir a circulação. Componentes da peçonha como hialuronidase atuam como fatores de espalhamento e são essenciais para a dispersão sistêmica do TsV (DE OLIVEIRA-MENDES et al., 2019). Os principais órgãos e tecidos que acumulam a peçonha após a inoculação, são, em ordem de maior concentração: rim, pulmão, fígado, coração e baço (REVELO et al., 1996). A composição da peçonha é bastante heterogênea como mostrado na Figura 2, sendo as principais toxinas, as neurotoxinas bloqueadoras de canais de sódio e potássio, metaloproteinase, serinoproteinase e hialuronidase. Estes componentes estão especialmente relacionadas com a promoção de sintomatologias mais severas durante o envenenamento (COLOGNA et al., 2009; PUCCA et al., 2015a).

Figura 2: Principais componentes da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. Retirada de (PUCCA et al., 2015a).

A clínica dos pacientes após a picada é bastante variável, e está relacionada a fatores como tamanho do escorpião, quantidade de veneno inoculado, idade do paciente, peso, entre outros aspectos (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015). De maneira geral, as manifestações clínicas são classificadas em locais, moderadas ou severas. A picada do escorpião é muito dolorosa, e a dor está presente na maioria dos casos após a picada. A dor intensa no local de inoculação vem acompanhada de edema, rubor, calor e em alguns casos, agitação, taquicardia e náuseas, todos estes estando relacionados com a intensidade da dor após a picada (KHATTABI et al., 2011; CUPO, 2015). Sintomas moderados se apresentam de maneira dependente de excitação autonômica, como salivação, lacrimejamento, sudorese intensa, manifestações mais severas de vômito e agitação, taquicardia e hipertensão arterial (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015). Já os sintomas severos estão relacionados com a junção dos sintomas anteriores com dois grandes eventos: edema pulmonar e choque cardiogênico. Estes eventos tem influência da exacerbação da resposta imune e resposta autonômica simpática e parassimpática (CUPO; HERING, 2002; GOWDA; FOX; KHAN, 2008; KHATTABI et al., 2011; ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015; ZOCCAL et al., 2016).

Alguns sintomas são indicativos das diferentes classificações clínicas, e exames laboratoriais também auxiliam na classificação da severidade do envenenamento. Glicosúria e cetonúria, leucocitose e hiperglicemia são achados importantes, além de alterações de marcadores cardíacos séricos como CK-MB e alterações em eletrocardiograma, presente geralmente nos casos moderados e graves (CUPO, 2015).

As abordagens de tratamento para o escorpionismo variam de acordo com a severidade do caso. De maneira geral, os pacientes recebem tratamento sintomático, como bloqueio anestésico para dor, uso de analgésicos, e compressas no local da picada, além de preservação das funções vitais, como ventilação mecânica, hidratação e suplemento de oxigênio, e, em casos mais graves, administração do soro (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014). A terapia com soro antiescorpiônico ainda é tema de debates para os casos de envenenamentos moderados. Importante ressaltar que, o uso do soro antiescorpiônico também não é garantia de que não haverá manifestações cardiovasculares, especialmente para os casos graves (CUPO, 2015). Apesar da discordância entre os profissionais de saúde, o protocolo clínico de tratamento segue a seguinte conduta: uso de soro em crianças com idade inferior a 7 anos, 3 ampolas de soro para casos moderados e 6 ampolas de soro para casos graves. Em pacientes com mais de 7 anos ou adultos, a dor é tratada inicialmente juntamente com terapia de suporte com bloqueio anestésico e então o paciente é observado. Caso o quadro clínico evolua, há a indicação de soro antiescorpiônico (quando não disponível, pode ser utilizado o soro antiaracnídico) (CUPO, 2015).

1.2 Resposta imune induzida pela peçonha do *T. serrulatus*

O envenenamento pelo escorpião resulta em uma gama de manifestações clínicas que são principalmente atribuídas à ativação do sistema nervoso autônomo pelas toxinas da peçonha. De fato, os distúrbios dos sistemas simpático e parassimpático desempenham papéis importantes durante o envenenamento, pois resultam em eventos de bradicardia, taquicardia, arritmias, hipotensão, hipertensão, dentre outros. Entretanto, a peçonha do escorpião também induz um estado

inflamatório complexo que se assemelha à síndrome de resposta inflamatória sistêmica e à sepse aguda (CUPO, 2015). Após a picada de escorpião, as células do sistema imune inato são expostas à moléculas que compõem o veneno, se ligando a receptores de reconhecimento de padrões e ativando vias pró-inflamatórias que contribuem para indução de edema pulmonar e, eventualmente, morte (ZOCCAL et al., 2014, 2018a; REIS et al., 2019).

Descrito pela primeira vez em 1999 (MAGALHÃES et al., 1999), o aumento dos níveis séricos de mediadores inflamatórios em pacientes envenenados pela TsV motivou novas pesquisas sobre mecanismos imunológicos associados às manifestações clínicas graves. Embora muitos relatos de casos tenham descrito manifestações clínicas causadas por envenenamento por TsV, apenas alguns estudos abordaram a possível ligação entre a inflamação e a fisiopatologia do escorpionismo. Achados comuns em humanos incluem leucocitose e recrutamento de neutrófilos para os pulmões (CUPO et al., 1994; KUMAR et al., 2012). Além disso, há evidências de que o envenenamento por TsV induz uma "tempestade de citocinas" e inflamação sistêmica, refletida por níveis plasmáticos elevados de interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL -6, IL-8, interferon- γ (IFN- γ), fator estimulador de colônias de granulócito-monócito (GM-CSF) e IL-10 (MAGALHÃES et al., 1999; FUKUHARA et al., 2003).

O primeiro estudo que abordou respostas de macrófagos ao TsV mostrou que o extrato bruto de veneno induz a produção dose-dependente de interferon- γ (IFN- γ), IL-6 e óxido nítrico (NO) (PETRICEVICH, 2002). Outros estudos descreveram a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por macrófagos estimulados por TsV, incluindo IL-1 α , IL-1 β e IL-10 (PETRICEVICH; LEBRUN, 2005; PETRICEVICH et al., 2007). Macrófagos também aumentam a atividade fagocítica e

a formação de vacúolos após estimulação com Ts1, uma toxina purificada do TsV (PETRICEVICH et al., 2008). De fato, Ts1 é altamente relevante no contexto da ativação de macrófagos por TsV. Zoccal et al. demonstraram que os macrófagos murinos J774.1 respondem a Ts1 e Ts6 produzindo mediadores pró-inflamatórios (ZOCCAL et al., 2011). Ts2 e Ts6 também são relevantes no processo inflamatório, induzindo a produção de mediadores lipídicos envolvidos com a resposta inflamatória, como a prostaglandina E₂ (PGE₂) e o leucotrieno B₄ (LTB₄) (ZOCCAL et al., 2013).

O TsV é reconhecido pelos PRRs de superfície, como os receptores Toll-like 2 (TLR2), TLR4 e CD14 (ZOCCAL et al., 2014) (Figura 3). Após o estímulo com o TsV, os macrófagos regulam positivamente a expressão desses receptores, que promovem a ativação de fatores de transcrição direcionados a genes que codificam mediadores inflamatórios. Tais vias incluem sinalização dependente de Myd88 e ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), bem como ativação c-Jun independente de Myd88 (AP1) (ZOCCAL et al., 2014) (Figura 3). Paralelamente à definição de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a dano (DAMPs) como ligantes de PRRs, o termo padrões moleculares associados a veneno (VAMPs) foi introduzido para definir moléculas que compõem venenos e peçonhas que atuam como ligantes em PRRs (Figura 3), induzindo respostas inflamatórias (ZOCCAL et al., 2014). O estímulo com o TsV também ativa o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR-γ) (ZOCCAL et al., 2015) (Figura 3) e também por CD36, um *scavenger* receptor que controla a ingestão lipídica nas células (ZOCCAL et al., 2018a). A ativação deste fator de transcrição depende da sinalização de TLR2/TLR4 e controla a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos, um fenômeno que está associado à produção

de mediadores lipídicos derivados de ácido araquidônico (AA) ou eicosanoides (CRESPO et al., 2010).

Figura 3. Ativação de macrófagos por TsV. Após estimulação com TsV, os macrófagos regulam positivamente os PRRs (TLR2, TLR4 e CD14) e o *scavenger receptor* CD36 que reconhece o veneno e ativa fatores de transcrição como AP-1, NF-κB e PPAR-γ, que estão correlacionados com a produção de citocinas/eicosanoides e formação de corpos lipídicos. Retirado de (REIS et al., 2019).

Devido às suas propriedades pró-inflamatórias, sabe-se que o TsV induz recrutamento celular no local de da picada, incluindo acúmulo de neutrófilos e macrófagos logo após a inoculação, e de linfócitos em tempos tardios (ZOCCAL et

al., 2013). Estudos *in vitro* utilizando linfócitos humanos isolados de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) mostraram que o TsV não é citotóxico para essas células, mas a peçonha inibiu a proliferação de linfócitos, promovendo a liberação de IL-6 (CASELLA-MARTINS et al., 2015). Usando toxinas isoladas do TsV, Pucca et al. descreveram que Ts6 e Ts15 na proliferação de células T e produção de IFN- γ (PUCCA et al., 2015b). Os autores descreveram que Ts6 inibiu a proliferação de subgrupos de células T de memória efetoras, enquanto Ts15 inibiu a proliferação de subgrupos de células T CD4⁺ de memória central e efetoras, sendo que essas toxinas inibiram completamente a hipersensibilidade tardia induzida por BSA em modelo murino (PUCCA et al., 2015b). Curiosamente, outra investigação indicou que a peçonha bruta é completamente excretada nas primeiras 24 horas após a inoculação (REVELO et al., 1996), sugerindo que o TsV pode interagir apenas com linfócitos de memória e/ou residentes *in vivo*. Apesar disso, os efeitos imunossupressores das toxinas de TsV em diferentes subgrupos de células T CD4⁺ oferecem um novo campo de estudos para explorar a atividade terapêutica de toxinas isoladas em doenças mediadas por linfócitos T CD4⁺.

O edema pulmonar e a disfunção cardíaca são as principais causas de morte durante o escorpionismo (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014). Recentemente, foi demonstrado que o edema pulmonar, mediado por PGE₂ e IL-1 β é uma das principais consequências da resposta inflamatória ao veneno (ZOCCAL et al., 2016). Como ocorre com outros estímulos (MEDZHITOV, 2001), o TsV induz o efluxo de K⁺ e ativa a plataforma multimérica denominada inflamassoma de NLRP3, que ativa caspase-1 para processar a forma imatura da citocina inflamatória IL-1 β (ZOCCAL et al., 2016). Ainda neste estudo foi descrito que a PGE₂ aumenta os níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) via receptores EP2/EP4,

ativando a proteína quinase A, e a atividade do NF- κ B, resultando na produção de IL-1 β pelos macrófagos. Em contraste, o LTB₄, via BLT1, diminui a liberação de cAMP, e as via de sinalização dependente de cAMP, e assim controla a produção de IL-1 β , a inflamação e a mortalidade causada por TsV (ZOCCAL et al., 2016). Também foi descrito que o receptor CD14 induz uma via pró-inflamatória promovendo liberação de PGE₂ por macrófagos, culminando na produção elevada de cAMP e IL-1 β . Além do CD14, o TLR4 também contribui para o mesmo fenômeno (ZOCCAL et al., 2018b). Em contraste, o CD36 foi o receptor envolvido com a produção de LTB₄, que suprimiu a inflamação pela diminuição de cAMP intracelular através do receptor BLT1 (ZOCCAL et al., 2018b). Coletivamente, esses estudos apontaram para alvos potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras. Esta hipótese foi testada em um estudo de prova de conceito usando o EP80317, um ligante do receptor CD36 (ZOCCAL et al., 2019). O tratamento com este peptídeo conteve a mortalidade causada pelo envenenamento por TsV, promovendo a produção de LTB₄ e atenuando a resposta inflamatória (ZOCCAL et al., 2019).

Além da estimulação das respostas imunes celulares, o TsV também ativa o Sistema Complemento (SC). Um estudo de Peres et al. descreveu níveis aumentados de componentes de SC imediatamente após o envenenamento (1 hora). Este evento foi refletido pela diminuição do hematócrito ao longo do tempo e aumento da atividade lítica das vias clássicas e alternativas do SC (BERTAZZI et al., 2003). Além disso, há evidências para a síntese de componentes da SC mesmo após 24 h de envenenamento, período em que o veneno foi depurado e secretado (SANTANA et al., 1996; BERTAZZI et al., 2003). Bertazzi et al. também demonstraram que o TsV ativa diretamente a clivagem do fator B e C3, gerando

anafilotoxinas que aumentam a inflamação devido às suas propriedades quimiotáticas (BERTAZZI et al., 2005). Nesse prisma, as respostas inflamatórias parecem ter bastante relevância na promoção dos sintomas clínicos e merecem atenção como possíveis alvos para inibição como estratégia para terapia de suporte ao uso do soro antiescorpiônico.

1.3 Alterações cardíacas induzidas pelo envenenamento: Achados e perspectivas

As alterações cardíacas observadas nos diferentes casos de envenenamento são bastante heterogêneas pelos fatores já citados anteriormente. Desse modo, é difícil precisar os mecanismos pelos quais ocorrem disfunções cardiovasculares durante o envenenamento. Corrado et al. mostraram os efeitos do TsV no coração isolado de cobaias, e descreveram que o veneno induz inicialmente um quadro de bradicardia seguido por taquicardia e arritmias, fenômenos estes abolidos pelo uso de β -bloqueadores (CORRADO; ANTÔNIO; DINIZ, 1968). A influência das catecolaminas na promoção de tais eventos também é discutida em outros trabalhos (ROSSI; FERREIRA; M., 1974; MIRANDA et al., 2015), assim como processos de inativação de tais aminas pela peçonha (CORRADO; NETO; ANTONIO, 1974; ROSSI; FERREIRA; M., 1974).

Existe ainda um papel relevante das toxinas moduladoras de canais de sódio que podem ter relação com as disfunções cardíacas observadas, afetando cardiomiócitos por retardar a abertura e fechamento dos canais de sódio nestas células (YATANI et al., 1988). Um dos principais achados patológicos durante o envenenamento pela peçonha do *T. serrulatus* é a disfunção do ventrículo esquerdo,

frequentemente observada em trabalhos de relatos de casos clínicos, principalmente em crianças (AMARAL et al., 1991; MIRANDA et al., 2015). Existem a sugestão de que a disfunção ventricular no escorpionismo se assemelha à Síndrome de Takotsubo ou cardiopatia do estresse (MIRANDA et al., 2015). Parâmetros cardíacos como hipoquinesia do ventrículo esquerdo, arritmia, e redução na fração de ejeção são achados atribuídos à “tempestade” de catecolaminas circulantes que aumentam nos pacientes após o envenenamento (HERING et al., 1993).

Outros estudos também abordam um efeito direto do veneno no coração. É importante ressaltar que este órgão concentra uma quantidade razoável de veneno após a picada (REVELO et al., 1996). Achados como focos de miocitólise coagulativa no tecido cardíaco também relacionam necrose nas células do coração como possível mecanismo que leva à falência do órgão (TEIXEIRA et al., 2001a; BENVENUTI; DOUETTS; CARDOSO, 2002). Além disso, outros estudos sugerem um evento de isquemia cardíaca associada a espasmos microvasculares causados pela estimulação de catecolaminas (CUPO et al., 2007).

A partir de tais achados, é possível precisar que os mecanismos patológicos e fisiológicos que levam à disfunção cardíaca não chegam a um consenso. Alguns eventos são explicados por ativação autonômica ou ação direta do veneno no tecido cardíaco, mas o fato é que a administração do soro não garante o não surgimento de quadros cardíacos patológicos após a picada (CUPO, 2015), sugerindo que o veneno possa induzir uma resposta inflamatória aguda no tecido cardíaco que continua mesmo após a depuração do veneno.

Partindo dessa perspectiva, surge a hipótese de que, assim como ocorre no edema de pulmão, as alterações cardíacas observadas têm participação de um componente imune que é induzido pela peçonha. Não existem trabalhos na literatura

correlacionando distúrbios cardiovasculares do envenenamento com a resposta imune. A principal evidência para essa hipótese tem apoio no achado clínico de que disfunções cardíacas ocorrem mesmo após a aplicação do soro, sugerindo que uma resposta imune, previamente estimulada antes da neutralização da peçonha, pode ter relação com as alterações cardíacas observadas.

2. Justificativa e Objetivos

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A relevância dos estudos de envenenamento se justifica pelo número de casos de escorpionismo crescente a cada ano, assim como o número de óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O estudo da influência das respostas inflamatórias no agravamento do quadro clínico também chama a atenção para o fato de que o escorpionismo vai além dos efeitos neurotóxicos. Em relação às alterações cardíacas, os estudos mostram que não há um consenso em relação as alterações ocorridas e a intensidade das mesmas (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015). Além disso, as manifestações cardíacas podem ter forte influência da resposta imune, visto que estas podem se manifestar mesmo após a administração do soro antiescorpiônico (CUPO, 2015). Logo, é fundamental a investigação da influência da resposta imune desencadeada pela peçonha do *T. serrulatus* na disfunção cardíaca observada nos quadros de envenenamento severo.

Neste projeto, tivemos como objetivos:

Objetivo geral

Avaliar o papel da resposta imune induzida pela peçonha do *T. serrulatus* na promoção da disfunção cardíaca em modelo murino de envenenamento severo.

Objetivos específicos

Em camundongos envenenados com dose letal (180 µg/kg.i.p.) da peçonha de escorpião (TsV), investigamos:

- a. A produção dos mediadores inflamatórios, PGE₂ e IL-1β, no tecido cardíaco;
- b. As células cardíacas responsáveis pela produção de tais mediadores e quais as vias intracelulares envolvidas na produção dos mesmos;
- c. O papel dos mediadores inflamatórios na disfunção cardíaca e morte dos animais;
- d. A participação do sistema autônomo e a interação neuroimune responsável pelo choque cardiogênico e morte dos animais.

3. Material e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (TsV)

O veneno liofilizado obtido do escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*) utilizado neste estudo foi fornecido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil. Resumidamente, o veneno foi extraído por estimulação elétrica, seguido por liofilização e armazenado a -20 ° C. Em todos os experimentos, o TsV foi diluído em PBS estéril e filtrado numa membrana esterilizadora de 0,22 µm (Milipore, EUA). Após, foi realizado o teste de detecção de LPS (LAL; QCL-1000, Bio Whittaker, Cambrex Company, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as amostras de TsV, o LPS não foi detectado.

3.2 Animais

Para cultura primária de fibroblastos cardíacos (CFs) e cardiomiócitos (CMs), foram utilizados camundongos C57Bl/6 recém-nascidos (1-2 dias) obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Para estudos *in vivo*, camundongos machos adultos C57Bl/6 (6-8 semanas) e *Il1r1^{-/-}*, pareados por idade e peso em todos os procedimentos foram obtidos nas instalações da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os camundongos foram mantidos em ciclo claro/escuro com livre acesso à comida e água. A manutenção e experimentos com camundongos foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA-FCFRP) na Universidade de São

Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil (Processo nº 16.1.1081.60.5) e CEUA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (002/2018-1).

3.3 Cultura primária de células cardíacas e tratamentos farmacológicos *in vitro*

200 camundongos recém-nascidos foram utilizados para um rendimento de 10 placas de células de 24 poços. Os corações de camundongos C57Bl/6 neonatos (1-2 dias) foram retirados em câmara de fluxo laminar e digeridos com tampão de digestão com collagenase tipo II (Worthington Biochemical Group, Lakewood, EUA). Após 5 ciclos de digestão (digestão-centrifugação-troca de tampão de digestão), os cardiomiócitos e fibroblastos foram separados por gradiente Percoll® (GE Healthcare, EUA), coletados e incubados em meio enriquecido com glicose (25 mM), soro de bezerro recém-nascido (NBCS 10%) e os antibióticos penicilina e estreptomicina (P/S; 1%) e mantidos em estufa por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Em todos os experimentos, CMs (4x10⁵ células/poço) e CFs (8x10⁵ células/poço) foram incubados com meio ou 50 µg ml⁻¹ de TsV durante 24 h a 37 °C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Os seguintes tratamentos foram realizados em diferentes experimentos: PGE₂ (Cayman Chemical Company, EUA), 10 µM, 10 min antes do estímulo com TsV; Antagonista de EP2 AH6809 (Cayman Chemical Company, EUA), 1 µM, 30 min antes do estímulo de TsV; KCl/NaCl (Sigma-Aldrich / Merck, EUA), 50 mM com TsV durante 24 h; Inibidor de PKA, composto H89 (Sigma-Aldrich / Merck, EUA), 25 µM, 2 h antes do estímulo com TsV. Em todos os experimentos, com exceção da quantificação de cAMP, após 24 h de estímulo com TsV, os sobrenadantes foram coletados para quantificação de IL-1β e PGE₂. As células aderidas foram utilizadas para qRT-PCR.

3.4 Experimentos *in vivo*

Em todos os experimentos e condições, camundongos adultos C57Bl/6 e *Il1r1^{-/-}* (22-25g) foram previamente pesados e depois inoculados com dose letal de 180 $\mu\text{g kg}^{-1}$ intraperitonealmente (i.p.) (ZOCCAL et al., 2016). Após 15, 30 e 60 min, o coração foi removido e utilizado para quantificação de IL-1 β e PGE₂ (Figura 4 a, b). Com base no tempo de duração desses mediadores, escolhemos 60 min de envenenamento para continuar os experimentos, que também é referido como ponto final humanitário. Coração e, em alguns experimentos, os pulmões, foram removidos 60 min após a inoculação da peçonha e estes órgãos foram empregados para qRT-PCR, western blotting e análise histológica. Para análise da pressão arterial e frequência cardíaca, os animais C57Bl/6 e *Il1r1^{-/-}* foram anestesiados com uma mistura de 2% de isoflurano e 10% de O₂ e mantidos sob temperatura controlada. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob condições assépticas sob visão de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcelos modelo MCM 5, São Paulo). Os camundongos foram colocados em decúbito dorsal e submetidos à cervicotomia. Cateteres de polietileno PE-10 (0,61 mm de diâmetro externo e 0,28 mm interno, Clay-Adams) foram inseridos na artéria carótida esquerda para registro da pressão arterial. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (DPT-100, Deltran®, Utah Medical Products Inc., EUA) e a pressão arterial foi continuamente mensurada (4 kHz) usando um computador equipado com uma interface analógico-digital (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). A pressão sanguínea foi medida antes da inoculação do TsV por 30 minutos, e após o registro de TsV por até 2 horas. Os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical precedido por anestesia com cloridrato de quetamina (75 mg kg^{-1}) e cloridrato de xilazina (10 mg kg^{-1}) por via intraperitoneal. A frequência

cardíaca foi derivada da medição da pressão arterial. Para experimentos de ecocardiograma, os animais foram anestesiados com uma mistura de 2% de isoflurano e 10% de oxigênio e mantido sob temperatura controlada. O exame ecocardiográfico com Doppler foi realizado utilizando o ecocardiógrafo Vevo 2100 System (Visual Sonics, Toronto, ON M4N 3N1, Canadá) com uma sonda de 30 MHz. Os animais foram posicionados para obter o melhor eixo e registro das imagens. Com visualização bidimensional do ventrículo esquerdo em eixo longo, foi obtida uma imagem em modo M. A partir da imagem modo M, foram obtidos os seguintes parâmetros (em mm): espessura do septo interventricular diastólico, diâmetro interno do ventrículo esquerdo diastólico, parede livre do ventrículo esquerdo diastólica, espessura do septo interventricular sistólico, diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole e parede livre do ventrículo esquerdo. A fração de encurtamento (%) foi calculada a partir desses valores e a fração de ejeção, o volume sistólico e o débito cardíaco foram calculados pelo método de Teichholz.

3.5 Tratamentos farmacológicos *in vivo*

Para todos os experimentos *in vivo*, a dose letal previamente padronizada de TsV foi usada ($180 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.p.) (ZOCCAL et al., 2016). Em todos os tratamentos farmacológicos (em $300 \mu\text{l}$), o diluidor específico de cada droga ou “veículo” ou PBS (em $300 \mu\text{l}$), foi injetado em animais com ou sem TsV. Os seguintes tratamentos farmacológicos foram realizados em camundongos C57Bl/6 ou *Il1r1^{-/-}*: dexametasona (Aché Pharmaceutical Laboratories, SP, Brasil), 5 mg kg^{-1} , i.p., 15 ou 60 min após a inoculação com TsV, CAY10526 (Cayman Chemical Company, EUA), 1% de álcool em PBS, 5 mg kg^{-1} i.p. (PEREIRA et al., 2018), 24 h e 60 min antes da inoculação com TsV, PGE₂ (Cayman Chemical Company, EUA), (PBS + 0,01% de etanol, 1 mg

kg⁻¹ i.p. (LONG et al., 1991), 24 h e 15 min antes da inoculação com TsV; Propranolol (Sigma-Aldrich / Merck, EUA), 300 µl em PBS, 4 mg kg⁻¹ i.p. (RODRIGUES et al., 2015), 60 min antes de TsV inoculação; Atropina (Sigma-Aldrich / Merck, EUA) 300 µl em PBS, 2 mg kg⁻¹ i.p. (RODRIGUES et al., 2015), 60 min antes da inoculação com TsV; Indometacina (Sigma-Aldrich / Merck, EUA) 300 µl em Tris [hidroximetil] aminometano-HCl ; TRIS- HCl, pH 8,2, 2 mg kg⁻¹ i.p. (ZOCCAL et al., 2016), 15 min ou 60 min após TsV; AH 6809 e AH 23848 (Cayman Chemical Company, EUA) 5 mg kg⁻¹ i.p. (ZOCCAL et al., 2016), 24 h e 60 min antes da inoculação com TsV. Para a coleta de plasma para a quantificação de ACh, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina e uma punção cardíaca com seringas heparinizadas foi realizada para extração de sangue. O plasma foi separado usando centrifuga a 500 g por 10 min a 4 °C e imediatamente congelado em nitrogênio líquido até o uso.

3.6 Citometria de fluxo

As suspensões de células cardíacas foram obtidas após digestão tecidual a 37 °C por 1 h em tampão de digestão de 1 ml/coração (RPMI 1640, Liberase LT, Roche, Basileia, Suíça e DNase 0,5 mg ml⁻¹, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Os fragmentos de tecido foram passados através de um filtro com 100 µm de tamanho de poro (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA). Em seguida, as hemácias foram lisadas e as células restantes foram lavadas em PBS, centrifugadas e ressuspensas em RPMI 1640 contendo 5% de SBF. Suspensões de 1x10⁶ células de tecido cardíaco foram utilizadas em análises posteriores. Os seguintes anticorpos foram utilizados: CD11b (clone: M1 / 70); CD45 (clone: 30-F11); Ly6G (clone: RB6-8C5); MHC-II (clone: M5 / 144.15.2); F4 / 80 (clone: BM8); CD31

(clone: EPR17259); PDGFR- α (clone: APA5); CD14 (clone: rmC5-3); TLR4 (clone: MTS510); TLR2 (clone: 6C2). Os anticorpos utilizados para citometria de fluxo foram adquiridos da eBioscience (San Diego, Califórnia), BD Biosciences (Franklin Lakes, Nova Jérсия, EUA) ou Abcam (Cambridge, UK). A aquisição de dados foi realizada utilizando um citômetro de fluxo FACSFortessa e o software FACSDiva (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA). 100.000 eventos foram adquiridos para cada amostra. Os dados foram plotados e analisados usando o software FlowJo v.10.0.7 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EUA). Estratégias de gate são mostradas no Anexo I.

3.7 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Para qRT-PCR foram utilizados lisado de coração ou CFs. O RNA foi extraído utilizando kits de extração de RNA de acordo com as instruções do fabricante (Purelink, Ambion, EUA), e a quantificação determinada por ensaios fluorométricos (Qbit, Invitrogen, CA, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total de acordo com os protocolos do fabricante (kits de transcriptase reversa de cDNA de alta qualidade, Applied Biosystems, CA, EUA). Utilizou-se uma quantidade total de 50 ng de cDNA para qRT-PCR utilizando iniciadores Taqman para *Alox5*, *Alox5ap*, *Bltl*, *Blt2*, *Il1r1*, *Casp1*, *Nlrp3*, *Cd14*, *Cd36*, *Tlr2*, *Tlr4* e *Ptger2* utilizando StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA). *Gapdh* foi o gene de referência usado em todos os experimentos. Todas as reações foram realizadas em triplicata e os ciclos foram realizados nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 2 s e 60 °C por 20 s. O método $\Delta\Delta C_t$ foi realizado em todas as amostras para análise. Para o *heatmap*, a diferença de n-vezes em

relação ao controle (todas as expressões gênicas foram normalizadas por *Gapdh*) foi usada para traçar os resultados usando a plataforma *Heatmapper*.

3.8 Western blot

Corações de camundongos C57Bl/6 envenenados foram removidos e digeridos em tampão RIPA (Sigma-Aldrich / Merck, Darmstadt, Alemanha). Após esta etapa, a quantificação proteica do sobrenadante foi realizada utilizando reagentes de Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad, USA). Os sobrenadantes foram suspensos com Tampão de Amostra de LDS (4x) (Life Technologies, EUA), fervidos, e utilizados para corrida em gel de eletroforese SDS-poliacrilamida (10-15% gel) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 µm (GE HealthCare, EUA). As membranas foram bloqueadas com solução salina tamponada com Tris contendo Tween 20 0,01% e leite em pó desnatado a 5%. Os anticorpos monoclonais para PKA-γ clone [EP2647Y] (Abcam, EUA) e para PKA (fosfo T197) clone [EP2606Y] (Abcam, EUA) foram diluídos em tampão bloqueio para incubação. A detecção de anticorpos foi feita usando o Enhanced Chemiluminescence Reagent (GE HealthCare, EUA).

3.9 Quantificação de cAMP intracelular

Para quantificação de cAMP intracelular, 8×10^5 /poço de CFs foram incubados com 1 mL de DMEM sem soro, com ou sem PGE2 (10 µM) durante 3 min antes da estimulação com TsV (50 µg mL⁻¹) durante 5 min. Os sobrenadantes das células foram aspirados e as células lisadas por incubação durante 10 min com HCl 0,1 M, seguido de ruptura utilizando seringa esterilizada. O cAMP intracelular foi

quantificado por ELISA, utilizando o protocolo de acetilação, de acordo com as instruções do fabricante (Enzo Life Sciences, NY, EUA).

3.10 Quantificação de IL-1 β , PGE₂, acetilcolina e catecolaminas

A IL-1 β no sobrenadante do homogenato do coração, e quando indicado, nos pulmões ou sobrenadante da cultura de células foi quantificada utilizando o kit IL-1 β ELISA (BD Biosciences, EUA). Para a quantificação de PGE₂, o sobrenadante de homogenato de coração, pulmão ou soro foram previamente tratado em cartuchos Sep-Pak C18 (Waters Corp.) e as quantificações foram realizadas usando kit EIA (Enzo Life Sciences) ou espectrometria de massa de acordo com o método publicado anteriormente (SORGI et al., 2018). Para a quantificação de acetilcolina, o plasma de sangue heparinizado foi separado e utilizado em ensaio colorimétrico de acordo com as instruções dos fabricantes (Kit de Ensaio de Colina / Acetilcolina, Abcam, EUA) e com protocolo bem estabelecido na literatura (COTERO et al., 2019). Resumidamente, a colina livre é medida e, usando a mesma amostra, a enzima acetilcolinesterase é adicionada à amostra e a colina total é medida novamente. Depois, a colina total é subtraída da colina livre, resultando na estimativa da quantidade de ACh nas amostras de plasma. Catecolaminas plasmáticas foram medidas como descrito anteriormente (GAROFALO et al., 1996) usando HPLC (LC20AT-Shimadzu Proeminence, Japão) acoplado a um detector eletroquímico (Decade Lite-Antec Scientific, Holanda) com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2 de 5 μ m (Sigma-Aldrich, EUA). A atividade da acetilcolinesterase foi realizada em plasma de animais C57Bl/6 ou *11r^{-/-}* envenenados, de acordo com as instruções do fabricante (kit de atividade de Acetilcolinesterase, Abcam, EUA).

3.11 Microscopia eletrônica

Pequenos blocos (1 mm³) de tecido cardíaco da parede livre do ventrículo esquerdo de camundongos foram fixados com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%. As secções ultrafinas foram duplamente coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e examinadas num microscópio electrónico Zeiss EM109 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) operando a 80 kV e equipado com uma câmara Veleta CCD (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Alemanha).

3.12 Análise Estatística

Para a comparação de dois grupos, foi realizado o teste *t* de Student e para a comparação de vários grupos, a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. Para a análise de sobrevivência, o teste log-rank foi utilizado para a determinação da significância estatística. Em todos os testes, diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Curva tempo-resposta da produção de PGE₂ e IL-1 β pelo tecido cardíaco após envenenamento com dose letal da peçonha de *T. serrulatus*

Neste trabalho, foram utilizadas doses padronizadas em estudo prévio e a dose escolhida como dose letal foi de 180 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ZOCCAL et al., 2016). Após a padronização, animais C57Bl/6 adultos (6-8 semanas) foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com a peçonha bruta liofilizada diluída em 300 μl de PBS estéril. Animais controles receberam somente 300 μl de PBS i.p. Os animais foram eutanasiados nos tempos 15, 30 ou 60 minutos e o coração foi retirado para dosagem de mediadores. O coração dos animais inoculados com TsV apresentaram produção de PGE₂ e IL-1 β com diferença significativa, quando comparado com os inoculados com PBS, a partir de 15 minutos após o envenenamento, atingindo pico de produção após 60 min (Figura 4 a-b). Assim, o tempo de 60 min após o envenenamento foi o escolhido para os demais experimentos, com exceção das curvas de sobrevivência, ou em experimentos específicos como apontados nas figuras. Importante ressaltar, que 60 min após envenenamento foi definido por nós como ‘ponto final humanitário’, pois os animais estão no ápice das manifestações clínicas, que foram definidas como sudorese, secreção nasal e ocular, anergia e convulsões. Animais inoculados com PBS foram eutanasiados 60 min após.

Figura 4. PGE₂ e IL-1 β em tecido cardíaco após o envenenamento. Animais C57Bl/6 envenenados com a dose letal de TsV foram eutanasiados nos tempos 15, 30 e 60 min após a inoculação da peçonha. Animais inoculados com PBS foram eutanasiados 60 min depois da inoculação com PBS. Após eutanásia, o coração foi retirado e a quantidade de PGE₂ (a) e IL-1 β (b) foi determinada por ELISA. Os resultados representam média $\pm$ DP (n=5) de um experimento. one-way ANOVA foi utilizado para determinação da significância, sendo $P < 0.05$ considerado significativo. *PBS versus TsV.

4.2 Parâmetros utilizados para avaliação da severidade do envenenamento

Para determinar a severidade do envenenamento empregamos os seguintes parâmetros: anergia (animais ficam em um canto da caixa sem se movimentarem), convulsão, sudorese, secreção ocular e secreção nasal que juntos foram empregados para determinar o *score* clínico. A Figura 5a mostra que todos os animais inoculados com a dose letal apresentavam pelo menos 3 dos sinais que também são relatados como presentes em humanos com envenenamento grave. Outra alteração que ocorre em humanos após a picada do escorpião em casos severos é o aumento da glicose no sangue circulante. Assim, também avaliamos a hiperglicemia nos animais letalmente envenenados, e comprovamos que nos camundongos a glicose no sangue passa de 100 µg/dl nos animais com PBS (barra preta), para 300-500 µg/dl 60 min após a inoculação do TsV (barra vermelha) (Figura 5b). O número de células totais no sangue periférico também foi avaliado, e observamos que nos animais envenenados ocorre aumento do número dos leucócitos totais e de neutrófilos, concomitante com a diminuição de células mononucleares circulantes (Figura 5c-e). Assim, o envenenamento com dose letal de TsV induz alterações significativas e semelhantes às aquelas observadas nos quadros de envenenamento severo em humanos.

Figura 5. Alterações sistêmicas induzidas pelo veneno de escorpião em camundongos. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com dose letal de TsV (180 µg kg⁻¹ i.p.) e o score clínico avaliados até 60 min, quando os animais foram eutanasiados e o sangue circulante obtido. Em (a) score clínico: anergia, convulsão, sudorese, secreção ocular e nasal; (b) Glicemia; (c) Leucócitos totais circulantes; (d) neutrófilos circulantes; (e) células mononucleares circulantes. Os dados representam média ± DP (n = 5) de um experimento. Teste *t* de Student foi utilizado para determinação da significância, sendo *P* < 0.05 considerado significativo. *PBS versus TsV.

4.3 Avaliação dos batimentos cardíacos e pressão arterial após o envenenamento

Além das alterações sistêmicas induzidas pela peçonha, também foi investigado os efeitos do envenenamento nos batimentos cardíacos e pressão arterial de animais C57Bl/6 envenenados com dose letal da peçonha. Através de técnica de canulação da carótida acoplada a um transdutor de pressão, com os batimentos cardíacos sendo derivados da medida de PA, os animais apresentam um pico de hipertensão entre 15 e 30 minutos, reflexo da dor induzida pela inoculação e, logo após 30 min de envenenamento, há o declínio da pressão arterial de maneira irreversível culminado na morte do animal (Figura 6a). Em relação aos batimentos cardíacos, há uma discreta taquicardia nos primeiros 15 minutos, também reflexo da dor induzida pela peçonha e, logo após 15 minutos, os eventos de bradicardia tem queda contínua (Figura 6b). Estes dados indicam que eventos cardíacos importantes são induzidos no envenenamento em camundongos e são semelhantes àqueles observados em humanos.

Figura 6. Pressão arterial e batimentos cardíacos em camundongos letalmente envenenados com peçonha do escorpião amarelo. A artéria carótida de camundongos C57Bl/6 foi canulada antes da administração do TsV, sendo os valores dos registros realizados neste tempo considerados como tempo zero. O registro contínuo foi realizado para determinar a (a) pressão arterial média e a (b) derivação da frequência cardíaca a cada 15 min após o envenenamento. Os dados representam média $\pm$ DP ($n = 3$) de um experimento.

4.4 A peçonha do escorpião *T. serrulatus* induz inflamação no tecido cardíaco

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que TsV induz inflamação estéril nos pulmões (ZOCCAL et al., 2016; REIS et al., 2019), mas nada foi investigado sobre o tecido cardíaco. Empregando citometria de fluxo de suspensão de células do coração de animais envenenados com dose letal da peçonha, observamos que ocorre aumento na porcentagem de neutrófilos e diminuição de macrófagos, semelhante ao que ocorre no sangue periférico. A análise de expressão gênica no tecido cardíaco mostrou um aumento dos genes *Alox5*, *Alox5ap*, *Blt1*, *Blt2*, *Il1r1*, *Casp1*, *Nlrp3*, *Cd14*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Cd36* e *Ptger2* (Figura 7c). A peçonha induziu aumento de PGE₂ no tecido cardíaco e sistemicamente (soro) (Figura 7d-e), assim como de IL-1 β no tecido cardíaco, sendo que a produção desta citocina ocorre via ativação de inflamassoma de NLRP3, uma vez que no coração de animais *knock-outs* para *Nlrp3*, *Casp1*, e *Asc* não observamos aumento de IL-1 β após o envenenamento (Figura 7f). Ambos os mediadores PGE₂ e IL-1 β são classicamente descritos como os principais mediadores induzido pelas peçonhas, tendo um papel essencial para inflamação pulmonar e morte dos animais (ZOCCAL et al., 2016).

Figura 7. Peçonha de *T. serrulatus* induz inflamação no tecido cardíaco e aumento de PGE₂ sistemicamente. Camundongos C57Bl/6 foram inoculados com dose letal da peçonha e, após 60 min, o coração foi removido para as diferentes análises mostradas acima. **(a)** citometria de fluxo da suspensão de células cardíacas para determinar o infiltrado inflamatório empregando os anticorpos indicados para marcação de neutrófilos e macrófagos **(a-b)**. **(c)** Expressão gênica por qRT-PCR de genes inflamatórios no tecido cardíaco de animais envenenados com dose letal. Os resultados foram normalizados pela expressão do gene de referência *Gapdh*. O método $\Delta\Delta C_t$ foi utilizado para analisar os dados de qRT-PCR. **(d-f)** O coração de animais envenenados foi removido, homogeneizado e o sobrenadante utilizado para quantificação de PGE₂ e IL-1 β por ELISA (d,f), assim como PGE₂ no soro. Os dados representam média $\pm$ DP ($n = 5-8$) e representativos de 2 experimentos independentes. Teste *t* de Student foi utilizado para determinação da significância, sendo $P < 0.05$ considerado significativo. *PBS versus TsV.

4.5 Fibroblastos cardíacos (CFs), mas não cardiomiócitos, são responsáveis pela produção de IL-1 β no coração após estimulação com TsV

Tendo determinado que o TsV induz resposta inflamatória no tecido cardíaco, a seguir investigamos qual(is) célula(s) cardíaca estaria(m) envolvida(s) no reconhecimento da peçonha e produção de mediadores. Para isso, camundongos C57Bl6 neonatos (1-2 dias) foram utilizados para obtenção de células cardíacas para cultura primária de fibroblastos cardíacos (CFs) e cardiomiócitos (CMs). Estas foram semeadas na densidade de 8×10^5 e 4×10^5 , respectivamente, e estimuladas com $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de TsV, por 24 horas. Células incubadas com meio foram utilizadas para comparação. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para quantificação de IL-1 β e PGE $_2$. Somente CFs foram capazes de produzir IL-1 β (Figura 8a) acima dos valores encontrados com apenas meio, apesar dos dois tipos celulares produzirem PGE $_2$ após à estimulação com TsV (Figura 8b).

Figura 8. Mediadores inflamatórios liberados por CFs e CMs estimulados com TsV. (a-b) CFs (8×10^5 células/poço) e CMs (4×10^5 células/poço) foram isolados a partir de camundongos C57Bl/6 neonatos e incubados com meio ou TsV ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) por 24 h para quantificação de IL-1 β (a) e PGE₂ (b) por ELISA. Os dados representam média $\pm$ DP ($n = 4-5$ poços/condição) de um experimento. Teste t de Student foi utilizado para determinação da significância, sendo $P < 0.05$ considerado significativo. *Meio versus TsV.

4.6 Fibroblastos cardíacos (CFs) estimulados com TsV tem regulação positiva de genes inflamatórios e aumento da expressão de receptores de reconhecimento padrão (PRRs)

Sabendo que os CFs são responsáveis pela produção de IL-1 β no tecido cardíaco, investigamos as mudanças induzidas pelo envenenamento nesta célula, alterando seu fenótipo para uma célula inflamatória. Inicialmente, foi observado uma regulação positiva de genes relacionados ao reconhecimento da peçonha (*Tlr2*, *Cd14*), ativação de inflamassoma de NLRP3 (*Il1b*, *Asc*, *Casp1* e *Nlrp3*) e eicosanoides (*Ptger2* e *Ptgs2*) (Figura 9a). Além disso, analisamos a expressão de PRRs na superfície de fibroblastos cardíacos no coração de animais C57Bl/6 inoculados com dose letal de TsV ou PBS. Estas células tem aumento da expressão de CD14 e TLR4 na superfície, no entanto, sem aumento significativo do receptor TLR2 (Figura 9b). Estes receptores que são essenciais para o reconhecimento do TsV e indução da resposta imune (ZOCCAL et al., 2014). Os dados sugerem que os CFs reconhecem a peçonha através de PRRs, ativando uma resposta inflamatória em uma célula não imune.

Figura 9. Aumento de PRRs e expressão gênica de componentes inflamatórios em fibroblastos cardíacos (CFs) após estimulação com TsV.

(a) Em CFs cultivados com TsV ($50 \mu\text{g ml}^{-1}/24 \text{ h}$) ou meio, foi determinada a expressão relativa de mRNA dos genes *Ptger2*, *Tlr2*, *Tlr4* e *Cd14*, *Il1b*, *Casp1*, *Asc*, *Nlrp3* (os quatro últimos, também em 6 h) ($n = 3$ por grupo). (b) TLR2, TLR4 e CD14 analisados em fibroblastos cardíacos por citometria de fluxo do coração de animais C57Bl/6 60 min após a inoculação com TsV ou PBS. Os dados representam média $\pm$ DP ($n=4$) de um experimento. Teste *t* de Student foi utilizado para determinação da significância, sendo $P < 0.05$ considerado significativo. *PBS versus TsV.

4.7 Fibroblastos Cardíacos (CFs) produzem IL-1 β via ativação do eixo PGE₂/EP2/cAMP/PKA/NF- κ B

Para a ativação do inflamassoma NLRP3 e a liberação de IL-1 β induzida por vários estímulos, incluindo o TsV, é necessário um evento de “segundo sinal”, como efluxo de K⁺, por exemplo. Assim, investigamos o mecanismo pelo qual a IL-1 β é induzida em CFs estimuladas pelo TsV. Nossos resultados confirmaram que para a produção de IL-1 β por CFs estimulados por TsV é necessário efluxo de K⁺ e sinalização de PGE₂-EP2, uma vez que uma concentração elevada de K⁺ extracelular (mas não NaCl), e o uso de antagonista do receptor EP2 (composto AH 6809) (Figura 10a-b) diminuem significativamente o aumento de IL-1 β . Além disso, a IL-1 β e a adenosina monofosfato cíclica 3', 5' (cAMP) são aumentadas pelo pré-tratamento com PGE₂ exógena antes do TsV (Figura 10b-c).

Também investigamos a expressão da forma total e fosforilada de PKA em homogenato de coração de camundongos inoculados com TsV (Figura 10d), encontrando ambas as formas aumentadas. A inibição de PKA em CFs com o composto H89 previamente à estimulação com TsV diminui a liberação de IL-1 β (Figura 10e). Esses dados indicam que, nos CFs, o TsV induz a produção de IL-1 β dependente da ativação do inflamassoma de NLRP3 por mecanismo dependente de PGE₂/EP2/cAMP/PKA/NF- κ B, semelhante ao encontrado em trabalhos prévios publicados pelo nosso grupo empregando macrófagos estimulados por TsV. O mecanismo está resumido na Figura 11. Os dados encontrados indicam que no envenenamento grave por escorpião ocorre inflamação do tecido cardíaco induzido por TsV em fibroblastos cardíacos, adicionalmente ao processo inflamatório sistêmico.

Figura 10. Produção de IL-1β por fibroblastos cardíacos é dependente do eixo PGE₂/EP2/cAMP/PKA/NF-κB. (a) CFs foram estimulados com TsV (50 µg ml⁻¹) na presença de KCl (50 mM) ou NaCl (50 mM), e IL-1β foi quantificada no sobrenadante da cultura de células. Células incubadas com somente meio foram usadas como controle. (b-c), IL-1β (b) ou cAMP (c), foram quantificados no sobrenadante de CFs pré-tratados ou não com PGE₂ (10 mM / -10 min), na presença ou ausência de antagonista de EP2 (AH 6908, 1 µM, -30 min), seguido de incubação com TsV por 24h. (d) Coração de camundongos C57Bl/6 inoculados com PBS ou TsV foi removido 1 hora depois, para análises por western blot da PKA total e fosforilada (n=4/grupo) e os dados são representativos de dois experimentos. (e) CFs pré-tratados ou não com inibidor de PKA (H89, 25 µM / -2 h) e estimulados com TsV para quantificação de IL-1β. Em todas as culturas, os CFs foram estimulados 24 h (exceção 5 min para cAMP). Os dados representam médias ± DP (n = 4 poços/condição) de um experimento. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$, de acordo com o teste *t*-Student ou ANOVA de uma via, com o pós-teste de Bonferroni comparando *meio versus TsV; #TsV versus tratamentos; &PGE₂ versus antagonista de EP2.

Figura 11. Esquema de ativação de CFs pelo TsV. Sumário dos resultados descrevendo a via de ativação dos fibroblastos, que mostram que o TsV é reconhecido pelos PRRs dos CFs, resultando na ativação do inflamassoma de NLRP3 e na liberação de IL-1β. A produção de IL-1β é amplificada por PGE₂, que aumenta a produção de cAMP e ativação de PKA, resultando em maior ativação de NF-κB e produção desta citocina.

4.8 A ausência do receptor IL-1R ou o tratamento com dexametasona revertem a bradicardia e a diminuição da pressão arterial no envenenamento severo

Para explorar o impacto da inflamação local e sistêmica na função cardíaca durante o envenenamento grave, empregamos abordagens genéticas e farmacológicas. Os animais C57Bl/6 tratados terapeuticamente com dexametasona (DEX) ou *Il1r1^{-/-}* envenenados com dose letal da peçonha foram submetidos à canulação da artéria carótida para aferição da pressão arterial e derivação dos batimentos cardíacos. Animais tratados com DEX ou *Il1r1^{-/-}* não exibiram alterações significativas na pressão arterial média ou na frequência cardíaca (Figura 12 a-b), diferentemente dos animais C57Bl/6 envenenados com dose letal e sem tratamento. Este resultado sugere que o evento que leva à disfunção cardiovascular pode ter influência de mediadores inflamatórios induzidos pela peçonha.

Figura 12. Pressão arterial (PA) e batimentos cardíacos (BP) de animais C57Bl/6 tratados ou não com dexametasona e *Il1r1*^{-/-} letalmente envenenados.

A artéria carótida de camundongos C57Bl/6 envenenados tratados ou não com dexametasona ou animais ou *Il1r1*^{-/-} foi canulada antes da administração do TsV e a PA e BP foram avaliados por 30 min antes da inoculação do TsV. O registro contínuo foi realizado para determinar a pressão arterial média (a) e a derivação da frequência cardíaca (b) a cada 15 min após o envenenamento até 120 min. Os dados representam média $\pm$ DP (n=4-5) de um experimento. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$, utilizando ANOVA de uma via, com o pós-teste de Bonferroni comparando *C57Bl/6 versus C57Bl/6 + DEX ou *Il1r1*^{-/-}.

4.9 A ausência do receptor IL-1R ou o tratamento com dexametasona preservam as funções cardíacas de animais envenenados com TsV

A fim de avaliar as disfunções cardíacas induzidas pela peçonha e a influência da resposta imune na mesma, foi realizado exame de ecocardiograma em animais C57Bl/6 antes e após o envenenamento, tratados ou não com DEX, e em animais *Il1r1^{-/-}* envenenados. Os resultados mostraram que, assim como em humanos, camundongos C57Bl/6 apresentam disfunção do ventrículo esquerdo após o envenenamento, refletidos pela diminuição na fração de ejeção (FE), volume sistólico (VS) e débito cardíaco (DC). Tais alterações não foram observadas nos animais tratados com DEX ou *Il1r1^{-/-}* envenenados (Figura 13 a). Além disso, as imagens em Modo-M do ventrículo esquerdo mostram um prejuízo na ritmicidade dos movimentos sistólicos e diastólicos e aumento da câmara cardíaca, fenômeno este que ocorre de maneira mais discreta (ou até mesmo ausente) em animais tratados com DEX ou *Il1r1^{-/-}* envenenados (Figura 13 b).

Figura 13. O tratamento com dexametasona ou a ausência do receptor IL-1R preservam as funções cardíacas no envenenamento severo. (a) O ecocardiograma foi realizado antes e 45 min após inoculação com dose letal de TsV e os seguintes parâmetros avaliados: fração de ejeção, volume sistólico e débito cardíaco. **(b)** Imagem representativa em modo-M do ventrículo esquerdo dos três grupos de animais. Os dados representam média $\pm$ DP (n=5-6) de um experimento. Teste *t* de Student foi utilizado para determinação estatística, com $P < 0.05$. * Basal versus TsV.

4.10 A ausência do receptor IL-1R ou o tratamento com dexametasona previnem as manifestações sistêmicas e morte no envenenamento

Animais C57Bl/6 envenenados, tratados ou não com DEX ou animais *Il1r1^{-/-}* foram avaliados quanto a sobrevida e as manifestações sistêmicas, aqui refletidas por um *score* clínico refletido pelos sintomas (anergia, convulsão, secreção ocular e nasal e sudorese) apresentados pelos camundongos no tempo de 60 min após o envenenamento. Observamos que 100% dos animais letalmente envenenados morrem, em contrates com 100% de sobrevida dos animais envenenados e tratados com DEX. Além disso, animais WT tratados com DEX tiveram diminuição do *score* clínico e produção de IL-1 β no tecido cardíaco (Figura 14 a, c-d). 80 % dos animais *Il1r1^{-/-}* envenenados com dose letal sobrevivem, além de apresentarem reduzido *score* clínico e ausência na produção de IL-1 β (Figura 15 b, e-f). Visando identificar alterações estruturais a nível microscópico no tecido cardíaco durante o envenenamento, a microscopia eletrônica do coração de animais C57Bl/6 tratados ou não com DEX e camundongos *Il1r1^{-/-}* letalmente envenenados foi realizada. A microscopia eletrônica de cortes do coração revelou tumefação mitocondrial apenas em cardiomiócitos de camundongos C57Bl/6 envenenados (Figura 15 a-b), indicando a contribuição de um fator inibido pela dexametasona (Figura 15c), via sinalização de IL-1R (Figura 15d). Estes dados indicam o papel de um componente inflamatório na indução da tumefação mitocondrial, e que alterações na mitocôndria podem contribuir para o comprometimento do balanço energético e função do coração no envenenamento.

Figura 14. O tratamento com dexametasona ou a ausência do receptor IL-1R previnem a mortalidade e as manifestações sistêmicas observadas no envenenamento severo. O tratamento terapêutico com dexametasona (5 mg/kg/i.p., 15 min após TsV) protege camundongos envenenados reverte a mortalidade induzida pelo envenenamento severo (a), diminui score clínico (c) e inibe a produção de IL-1 β no coração (d). Os animais *Il1r1^{-/-}* são resistentes a envenenamento e apresentam maior taxa de sobrevivência (b), não apresentam manifestações clínicas (e) e não aumentam a produção de IL-1 β no coração (f). Os dados representam média $\pm$ DP (n = 5 / grupo) e são representativos de três experimentos independentes. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$, de acordo com o teste t de Student ou One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, ou o teste de log-rank para sobrevivência. *C57Bl/6 versus C57Bl/6 + DEX ou versus *Il1r1^{-/-}*; #Basal ou PBS versus TsV.

Figura 15. A sinalização de IL-1 β /IL-1R induz tumefação mitocondrial em cardiomiócitos de camundongos envenenados. C57Bl/6 tratados ou não com dexametasona (5 mg/kg/i.p., 15 min após TsV) e camundongos *Il1r1*^{-/-} foram inoculados com PBS ou TsV (180 μ g/kg/i.p.), e 1 h após o coração foi removido para análise ultraestrutural em microscopia eletrônica. (a) Os cardiomiócitos de camundongos C57Bl/6 inoculados com PBS apresentam numerosas mitocôndrias normais (M) com cristas densamente compactadas e matriz discreta. (b) Cardiomiócitos de animais C57Bl/6 envenenados apresentam mitocôndrias inchadas com cristas aparentes (*). (c) Cardiomiócitos de camundongos C57Bl/6 tratados com dexametasona exibem mitocôndrias preservadas. (d) Camundongos *Il1r1*^{-/-} envenenados apresentam um aspecto ultra estrutural similar na mitocôndria como os animais não envenenados C57Bl/6. Sarcômeros (S), corpúsculos lipídicos (L) e discos intercalados (seta) tem estrutura preservada em todos os grupos. Barra de escala = 1 μ m. Imagens são representativas de 5 animais por grupo.

4.11 O sistema autônomo parassimpático, mas não o simpático, contribui para a promoção das manifestações clínicas e mortalidade no envenenamento.

A liberação de catecolaminas e acetilcolina induzidas pelo TsV é extensivamente demonstrada na literatura. Posteriormente, investigamos a contribuição desses neurotransmissores nas disfunções cardíacas, *score* clínico e mortalidade. Foi encontrado aumento significativo de adrenalina e noradrenalina no plasma de camundongos C57Bl/6 envenenados com dose letal da peçonha (Figura 16a). No entanto, o antagonismo dos receptores beta-adrenérgicos com propranolol não melhorou a sobrevida dos animais (Figura 16b), nem o *score* clínico (Figura 16c) ou a produção de IL-1 β no coração (Figura 16d). De modo contrário, quando o aumento da acetilcolina no plasma de camundongos C57Bl/6 envenenados (Figura 17a) foi antagonizado por atropina, um antagonista de receptor muscarínico, foi observado que 100% dos animais sobrevivem ao envenenamento letal (Figura 17b). Há também uma inibição significativa do *score* clínico (Figura 17c), sem alterar, entretanto, a liberação de IL-1 β no coração e pulmão (Figura 17d-e). Estes resultados elucidam uma importante via de indução das alterações sistêmicas e mortalidade via neurotransmissores, com atenção especial para ACh, o único que, quando antagonizado, tem impacto no aumento de sobrevida e melhora dos sintomas clínicos.

Figura 16. O envenenamento induz aumento de catecolaminas circulantes. O plasma de animais C57Bl/6 envenenados com dose letal 60 min após os camundongos serem inoculados com PBS ou TsV para dosagem de catecolaminas circulantes por HPLC (a,b). Animais envenenados e pré-tratados 1 h antes da peçonha com veículo ou propranolol (4 mg/kg/ip) foram observados no máximo 250 minutos para registro da taxa de sobrevivência (c); o score clínico foi anotado até 60 min após a inoculação de TsV (d). Após a morte, o coração foi removido para quantificação de IL-1 β (e). Os dados representam médias $\pm$ DP (n = 4-5/grupo) de um experimento. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0.05$, de acordo com o teste t de Student ou One-way ANOVA, com o pós-teste de Bonferroni ou o teste de log-rank para sobrevivência. *PBS versus TsV, ou versus TsV + tratamentos.

Figura 17. O aumento de acetilcolina circulante tem impacto na sobrevivência e sintomas clínicos no envenenamento. O plasma de animais C57Bl/6 envenenados com dose letal 60 min após os camundongos serem inoculados com PBS ou TsV para dosagem de acetilcolina circulantes por métodos colorimétricos (**a**). Animais envenenados e pré-tratados 1 h antes do veneno com veículo ou propranolol (2 mg/kg/ip) foram observados no máximo 250 minutos para registro da taxa de sobrevivência (**b**); o score clínico foi anotado até 60 min após a inoculação de TsV (**c**). Após a morte, o coração e pulmão foi removido para quantificação de IL-1 β (**d**-**e**). Os dados representam médias $\pm$ DP ($n = 5$ / grupo) e são representativos de três experimentos independentes. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0.05$, de acordo com o teste t de Student ou One-way ANOVA, com o pós-teste de Bonferroni ou o teste de log-rank para sobrevivência. *PBS versus TsV, ou versus TsV + tratamentos.

4.12 O tratamento com atropina reverte as alterações cardíacas no envenenamento

Assim como a sobrevivência e o score clínico são influenciados no tratamento com atropina, o uso desse antagonista muscarínico também reverte as alterações cardíacas induzidas pelo envenenamento. Em exame de ecocardiograma, parâmetros como fração de ejeção, volume sistólico e débito cardíaco, assim como o ritmo dos movimentos sistólicos e diastólicos e tamanho da câmara cardíaca estão preservados (Figura 17).

Figura 18. A atropina reverte as alterações cardíacas induzidas pelo TsV. (a) O ecocardiograma do ventrículo esquerdo foi realizado antes e 45 min após a inoculação com dose letal de TsV em animais tratados ou não com atropina (1 h antes, 2 mg/kg/i.p.) e os seguintes parâmetros avaliados: fração de ejeção, volume sistólico e débito cardíaco. **(b)** Imagem representativa em modo-M do ventrículo esquerdo. Os dados representam média $\pm$ DP (n=5) de um experimento. Teste *t* de Student foi utilizado para determinação estatística, com $P < 0.05$.

4.13 O eixo IL-1R/PGE₂ regula o aumento de ACh

Baseados nos resultados da figura 14, que mostram uma clara influência da sinalização de IL-1R na promoção das alterações cardíacas observadas no envenenamento, e tendo em vista que os animais tratados com atropina também apresentam melhora nas manifestações sistêmicas, sobrevida e alterações cardíacas, elaboramos a hipótese de que existe uma regulação neuroimune influenciando as disfunções cardíacas observadas. Para isso, foi quantificado de maneira tempo-dependente a quantidade de ACh circulante em animais C57Bl/6 e *Il1r1^{-/-}*. Foi observado que somente animais WT possuem aumento de ACh circulante após o envenenamento (Figura 18a). Como o eixo de regulação IL-1 β /IL-1R/PGE₂ se mostrou relevante no modelo de envenenamento, a hipótese de que a ausência do receptor IL-1R estaria regulando PGE₂ foi confirmada (Figura 18c). Após, investigamos se PGE₂ estaria regulando a liberação de ACh. Como observado, animais tratados com DEX ou indometacina (Indo) não apresentam aumento na quantidade de ACh circulante quando administrados em tempos curtos após o envenenamento (Figura 18b). Estes dados sugerem que a liberação de ACh durante o envenenamento está sendo regulada por PGE₂.

Figura 19. O eixo IL-1 β /IL-1R/PGE₂ regula a liberação de ACh circulante no envenenamento. Para investigar o papel da PGE₂ na liberação de ACh foram realizadas experimentos em animais envenenados com dose letal de TsV ou inoculados com PBS: **(a)** Acetilcolina circulante foi quantificada em camundongos C57Bl/6 e *Il1r1*^{-/-} 15 e 60 min após o envenenamento (n = 5, representativo de dois experimentos), e em **(b)**, C57Bl/6 tratados ou não com dexametasona (5 mg/kg/ip) ou indometacina (2 mg/kg/ip) administrados 15 ou 60 min após o veneno (o sangue foi coletado 75 e 120 min após TsV) (n = 6 de dois experimentos com 3 animais cada). **(c)** PGE₂ do coração foi quantificada 60 min após a inoculação PBS ou TsV, em animais C57Bl/6 tratados ou não com dexametasona, e em camundongos *Il1r1*^{-/-} envenenados (n = 6 para C57Bl/6, e n = 3 para animais *Il1r1*^{-/-}). As diferenças foram consideradas significativas com *P* < 0,05, de acordo com o teste t de Student ou One-way ANOVA, com o pós-teste de Bonferroni. *PBS versus TsV, or versus TsV + tratamentos; #TsV versus TsV + tratamentos; &C57Bl/6 versus *Il1r1*^{-/-}.

4.14 A administração de PGE₂ em animais *Il1r1*^{-/-} ou a administração de inibidor de PGE₂-sintase em C57Bl/6 regula a liberação de ACh

Para corroborar a hipótese do eixo PGE₂-ACh no envenenamento, e visto que animais *Il1r1*^{-/-} não apresentam aumento na quantidade circulante deste neurotransmissor e nem de PGE₂, foi administrado intraperitonealmente PGE₂ (1 mg/kg/ip) em animais *Il1r1*^{-/-}, e que foram então envenenados com a dose letal da peçonha. A figura mostra que somente quando PGE₂ e TsV são administrados de maneira concomitante, há o aumento de ACh circulante (Figura 19a). De modo contrário, em animais C57Bl/6 tratados com inibidor da PGE₂-sintase, o aumento de ACh circulante é revertido (Figura 19b). De modo interessante, o aumento de ACh induzido por PGE₂ é revertido quando os animais são tratados com antagonistas dos receptores EP2/EP4, sugerindo que a influência deste mediador lipídico na liberação de ACh ocorre por indução via receptor (Figura 19a), e não porque a PGE₂ possui atividade inibidora de acetilcolinesterase (Figura 20a-b). Os achados estão sumarizados na Figura 21, que mostra que IL-1R amplifica a produção de PGE₂ sistemicamente, e este eicosanoide, via receptor EP2/EP4, aumenta a liberação de ACh, estando este neurotransmissor relacionado com as alterações sistêmicas e principalmente cardiovasculares promovidas no envenenamento severo.

Figura 20. PGE₂ induz liberação de ACh via receptor EP2/EP4. (a) Em camundongos *I11r1^{-/-}*, a acetilcolina circulante foi quantificada em animais tratados ou não com PGE₂ (1 mg/kg/i.p.) 24 h e 15 min antes da inoculação com TsV ou com antagonistas dos receptores EP2 ou EP4 (EP2 AH6809, 5 mg/kg/ip ou EP4 AH23848 5 mg/kg/ip 24 h e 1 h antes de TsV) (n = 4-5/grupo) de um experimento); (b) acetilcolina foi quantificada em camundongos C57Bl/6 envenenados pré-tratados com inibidor de PGE-sintase (composto CAY10526, 5 mg/kg/i.p./ 24 e 1 h antes de TsV) (n = 4/grupo de um experimento). Os dados representam médias ± DP. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$, de acordo utilizando One-way ANOVA, com o pós-teste de Bonferroni *Tratamentos PBS versus TsV, ou versus tratamentos TsV +; #TsV versus TsV + Tratamentos; \$PGE₂ + TsV versus antagonistas.

Figura 21. PGE₂ não inibe atividade da acetilcolinesterase (AChE). (a) C57Bl / 6 tratados ou não com inibidor de PGE-sintase (composto CAY10526, 5 mg/kg/i.p. 24 e 1 h antes de TsV), foram anestesiados e o sangue coletado para determinação da atividade de AChE no plasma. (b) Camundongos *Il1r1^{-/-}* tratados ou não com PGE₂ (1 mg/kg/i.p.) 24 h e 15 min antes da inoculação com TsV foram anestesiados e o sangue foi colhido para determinação da atividade de AChE no plasma. Dados representam médias $\pm$ DP (n = 4/grupo), de um experimento. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$, de acordo one-way ANOVA, com o pós-teste de Bonferroni.

Figura 22. Figura esquemática final. Os resultados mostram que o eixo IL-1 β /IL-1R/PGE₂/EP2-EP4/ACh provoca disfunções cardíacas e mortalidade no envenenamento severo pela peçonha do escorpião *T. serrulatus*.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

O envenenamento pelo escorpião constitui um grave problema de saúde pública, apesar da existência de um soro antiescorpiônico eficiente. O controle da alta incidência desses artrópodes nos meios urbanos é difícil de ser realizado devido a característica de reprodução desses animais além da ausência de pesticidas eficientes contra os mesmos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Apesar da eficiência do tratamento com o soro antiescorpiônico, a resposta imune tem um papel crucial no desenvolvimento dos sintomas clínicos induzidos pela peçonha (ZOCCAL et al., 2016), e a imunopatologia no escorpionismo nem sempre é controlada somente pelo soro. Em relação às alterações cardíacas, um segundo componente (inflamatório) parece estar correlacionado, uma vez que pacientes, mesmo após a administração do soro, podem ter manifestações cardíacas tardias (CUPO, 2015). Assim, nossa hipótese de trabalho foi que no envenenamento por escorpião, exista um *crosstalk* entre os mediadores do sistema autônomo e mediadores do processo inflamatório, resultando nas alterações cardíacas. Este é o primeiro estudo que buscou sistematicamente o entendimento dos mecanismos responsáveis pela disfunção cardíaca no escorpionismo considerando a participação do processo inflamatório.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem investigado o processo inflamatório induzido pelo TsV. Demonstramos anteriormente que o TsV (ou suas toxinas isoladas) induzem inflamação mediada por CD14, TLR2 e TLR4 presente em macrófagos, e que o edema pulmonar e a mortalidade são induzidos por PGE₂ e IL-1 β , e regulados por LTB₄ (ZOCCAL et al., 2011, 2013, 2014, 2015, 2016, 2018b, 2019; REIS et al., 2019). Além disso, demonstramos que CD14 e CD36 são importantes PRRs para regulação do processo inflamatório, uma vez que regulam a produção de PGE₂ e LTB₄ respectivamente (ZOCCAL et al., 2018a).

Para investigar a contribuição do processo inflamatório nas alterações cardíacas induzidas por TsV, investigamos quais células cardíacas eram responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios. Inicialmente, foi demonstrado que o tecido cardíaco reage ao envenenamento aumentando a expressão de genes inflamatórios relacionados a via da COX, 5-LO e receptores de reconhecimento de padrões, além da liberação de PGE₂ e IL-1 β . Esses mediadores se mostraram cruciais na mortalidade induzida pela peçonha em trabalhos prévios (ZOCCAL et al., 2016, 2018b, 2019). Além disso, a importância do inflamassoma de NLRP3 no coração também foi evidenciada neste trabalho, sendo a produção de IL-1 β cardíaca dependente desta plataforma celular, mecanismo semelhante ao encontrado em macrófagos (ZOCCAL et al., 2016). Neste contexto, os CFs apresentaram um fenótipo de célula inflamatória ao reconhecer a peçonha e produzirem mediadores pró-inflamatórios. De fato, CFs são descritos na literatura como células capazes de induzir resposta inflamatória, expressando inclusive PRRs para reconhecimento de PAMPs, DAMPs e nos casos de escorpionismo, VAMPs (PORTER; TURNER, 2009; BOZA et al., 2016; TURNER, 2016).

A plataforma de inflamassoma de NLRP3, identificada neste estudo como componente principal na liberação de IL-1 β madura em CFs também já foi evidenciada em trabalhos anteriores. A expressão de NLRP3 nestas células já foi descrita como aumentada em CFs após infarto do miocárdio, o que contribui diretamente para o tamanho da área infartada durante isquemia/reperfusão (SANDANGER et al., 2013). Além disso, Zhang e colaboradores descreveram que a ativação de NLRP3 em CFs como crucial para a indução de disfunção cardíaca durante sepse (ZHANG et al., 2014).

Nesse prisma, o papel da IL-1 β na disfunção cardíaca já foi demonstrado em estudos prévios. (BLUM; MILLER, 1998; PEIRÓ et al., 2017; TOLDO; VAN TASSELL; ABBATE, 2017; SZEKELY; ARBEL, 2018). Esta citocina possuía capacidade de dessensibilizar cardiomiócitos frente à uma estimulação adrenérgica, induzir disfunção contrátil reversível no músculo cardíaco, arritmias, dentre outras (BLUM; MILLER, 1998). O uso de Anakinra, um antagonista do receptor IL-1R, em quadros de disfunção cardíaca, apesar de falhar em recuperar a fração de ejeção diminuída, protege o coração de remodelamento (BLUM; MILLER, 1998; TOLDO; VAN TASSELL; ABBATE, 2017).

Em relação à produção de PGE₂ pelo tecido cardíaco frente ao estímulo com TsV, tanto CMs quanto CFs foram capazes de produzir este mediador. Estas células já foram descritas anteriormente como produtoras de diversos metabolitos da via do ácido araquidônico (LINSSEN et al., 1993). Estes metabólitos são inclusive capazes de alterar o funcionamento de canais iônicos, regular a transcrição de genes e remodelamento ventricular (JENKINS; CEDARS; GROSS, 2009). A principal via pela qual PGE₂ regula algumas funções cardíacas é a via intracelular de seus receptores EP2/EP4, que aumentam o eixo cAMP-PKA (ALIG et al., 2009; ZACCOLO, 2009). O aumento desses mensageiros intracelulares modulam receptores β -adrenérgicos (via β -arrestina) e modulam SERCA2, uma proteína envolvida na recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático e relacionado com o mecanismo de contração cardíaca (ZACCOLO, 2009). É importante ressaltar que a principal função da IL-1 β no modelo de envenenamento é a de regular a produção de PGE₂. Isto já foi demonstrado em trabalhos anteriores em modelos de macrófagos murinos (ZOCCAL et al., 2016) e em experimentos com estímulo direto de células cardíacas com IL-1 β , aumentando consideravelmente os níveis de PGE₂ (MENDEZ; LAPOINTE, 2002). No

envenenamento, o eixo IL-1 β /IL-1R amplifica a produção de PGE₂ não só nas células imunes, como também nas células cardíacas.

Durante o desenvolvimento deste estudo, foi constatado que animais *knockouts* para o receptor IL-1R ou tratados com dexametasona apresentam função cardíaca preservada, assim como aumento na sobrevivência quando envenenados letalmente. Interessante, os grupos de animais e tratamentos citados acima também são preservados das manifestações sistêmicas causadas pelo envenenamento, o que nos levou à hipótese de que IL-1 β está relacionada não só com os eventos de disfunção cardíaca, mas com alguns mediadores do sistema autônomo simpático e parassimpático classicamente relacionados com sintomas clínicos no escorpionismo.

As alterações mitocondriais reversíveis observadas nas imagens de microscopia eletrônica nunca foram descritas em casos de envenenamento até então. A tumefação mitocondrial pode não ter efeito direto na disfunção cardíaca observada, mas certamente pode comprometer a matriz energética de órgão, comprometendo assim seu funcionamento. A tumefação não ocorre nos animais *knockouts* para o receptor de IL-1 β ou com tratamento com dexametasona, o que é corroborado pela literatura em trabalhos que correlacionam “edema” na mitocôndria com o eixo IL-1 β -IL-1R (KOWLURU et al., 2011; CAO et al., 2013). Outra hipótese seria a de que o desbalanço do eixo cAMP-PKA esteja relacionado com as disfunções encontradas (NEVIERE et al., 2016). Nesse aspecto, mais estudos se fazem necessários para elucidar como a resposta inflamatória dependente de IL-1R induz patologia mitocondrial nos cardiomiócitos de camundongos envenenados.

A influência dos sistemas simpático e parassimpático no envenenamento já são extensivamente descritas na literatura desde a década de 60. Corrado e

colaboradores já haviam descrito que os efeitos da peçonha de escorpião sobre as manifestações clínicas são indiretos, uma vez que o TsV induz a liberação de ACh e norepinefrina (NOR), sugerindo também que o sítio de ação da peçonha seja nas terminações nervosas pós ganglionares (CORRADO; ANTÔNIO; DINIZ, 1968). De fato, sintomas associados à exacerbação na resposta autonômica se relacionam com as manifestações de taquicardia, hipertensão, midríase, convulsões, irritabilidade, priapismo, salivação, lacrimejamento, vômito, bradicardia, hipotensão, dentre outros (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014).

A exacerbação da resposta autonômica no escorpionismo é descrita como sendo resultado da ação das toxinas moduladores de canais iônicos presentes na peçonha. Quando o peçonha entra na circulação, esta tem a capacidade de atuar em fendas pré e pós ganglionares modulando a liberação de adrenalina e ACh (PUCCA et al., 2015a). Em nossos resultados, foi possível observar que no tempo de 15 min não há uma liberação de ACh, mas sim após 1 h de envenenamento, evento este que pode estar associado à uma ‘montagem’ da resposta imune e influência desta na liberação dos neurotransmissores. Neste contexto, trabalhos prévios demonstraram a influência da PGE₂ na liberação de ACh (DAS, MINATI; GANGULY, 1984; MULHOLLAND; SIMEONE, 1993).

Os sintomas que se manifestam em acidentes graves com escorpiões, como hiperglicemia, leucocitose, aumento de secreções, espasmos musculares, edema agudo de pulmão, bradicardia e taquicardia, arritmia cardíaca, hipotensão arterial e hipertensão, insuficiência cardíaca, dentre outros, são manifestações atribuídas à liberação de acetilcolina ou adrenalina, que muitas vezes são antagônicas e ditam a intensidade da resposta, como transitória ou de longo prazo (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015). Assim, a excitação direta do sistema nervoso

autônomo pelo veneno de escorpião tem sido considerada como o principal fator que leva a sintomas graves e mortalidade em humanos (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015). No entanto, recentemente demonstramos que em modelos experimentais de envenenamento pela peçonha do escorpião, a produção pulmonar de IL-1 β e PGE₂ é responsável pela inflamação e mortalidade (ZOCCAL et al., 2016).

Neste estudo, descobrimos que a sinalização de IL-1R induz PGE₂, a qual é indispensável para liberação de ACh, que por sua vez é o neurotransmissor responsável pela disfunção cardíaca e mortalidade. O TsV é reconhecido pelos PPRs nos CFs e em outras células imunes iniciando a inflamação pulmonar e cardíaca, dependente da PGE₂ induzida por IL-1 β -IL-1R. PGE₂-EP2/EP4 induz a liberação de ACh, responsável pela disfunção cardíaca observada no envenenamento. A ACh induzida por PGE₂ foi relatada anteriormente por diferentes grupos (DAS, MINATI; GANGULY, 1984; MULHOLLAND; SIMEONE, 1993). Demonstramos também que a tumefação mitocondrial ocorre por mecanismos dependentes da sinalização da IL-1R e pode comprometer a carga energética do coração. Além disso, a ativação do eixo cAMP-PKA tem sido implicada em alterações mitocondriais e miocárdicas durante a sepse (NEVIERE et al., 2016), e eventos semelhantes podem promover disfunção cardíaca adicional durante o envenenamento por escorpião.

Interessante, o tratamento do envenenamento por escorpião inclui soro antiescorpiônico combinado com tratamento de suporte, incluindo atropina para bradicardia e hipotensão graves (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014; CUPO, 2015) e corticoide para prevenir reações contra o soro (CUPO, 2015). Neste estudo, confirmamos a ação benéfica da dexametasona no envenenamento por escorpião. A

atropina antagonizou a ação da ACh induzido por PGE₂, e a dexametasona atuou como regulador da resposta imune, diminuindo o eixo IL-1R-PGE₂-ACh por inibir a liberação deste metabólito do AA e reduzir IL-1 β . Ambos os tratamentos resgataram a função cardíaca e melhoraram a sobrevida em modelo de envenenamento severo. Nossos resultados podem ter um enorme impacto social, especialmente em países como o Brasil, onde o número de picadas de escorpião é maior que a quantidade de todos os acidentes por animais peçonhentos juntos. O soro antiescorpiônico não é facilmente acessível em todos os ambulatórios clínicos, e o atraso no tratamento durante o deslocamento do paciente pode aumentar o risco de morte. Assim, propomos a administração de dexametasona como terapia de suporte no escorpionismo, além da administração de soro antiescorpiônico posteriormente, para prevenir a disfunção cardíaca e mortalidade no envenenamento severo.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

O eixo IL-1B/IL-1R/PGE₂/EP2-EP4/ACh controla as alterações cardíacas, manifestações clínicas e mortalidade no envenenamento severo pelo escorpião *T. serrulatus* em camundongos.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

- ALIG, J. et al. Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 29, p. 12189–12194, 2009.
- AMARAL, C. F. S. et al. Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after tityus serrulatus scorpion poisoning. **The American Journal of Cardiology**, v. 67, n. 7, p. 655–657, 1991.
- BENVENUTI, L. A.; DOUETTS, K. V.; CARDOSO, J. L. C. Myocardial necrosis after envenomation by the scorpion Tityus serrulatus. **Heart**, p. 275–276, 2002.
- BERTAZZI, D. T. et al. Effect of Tityus serrulatus scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 501–508, 2003.
- BERTAZZI, D. T. et al. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by Tityus serrulatus scorpion venom. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 6, p. 1077–1084, 2005.
- BLUM, A.; MILLER, H. Role of cytokines in heart failure. **American Heart Journal**, v. 135, n. 2 I, p. 181–186, 1998.
- BOZA, P. et al. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 β synthesis, secretion, and degradation. **Molecular Immunology**, v. 74, p. 96–105, 2016.
- CAO, Y. et al. Proinflammatory Cytokines Stimulate Mitochondrial Superoxide Flashes in Articular Chondrocytes In Vitro and In Situ. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- CASELLA-MARTINS, A. et al. Immunomodulatory activity of Tityus serrulatus scorpion venom on human T lymphocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 4–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s40409-015-0046-3>>.
- COLOGNA, C. T. et al. Tityus serrulatus scorpion venom and toxins: an overview. **Protein and peptide letters**, v. 16, p. 920–932, 2009.
- CORRADO, A. P.; ANTÔNIO, A.; DINIZ, C. R. Brazilian scorpion venom (Tityus serrulatus), an unusual sympathetic postganglionic stimulant. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 164, n. 2, p. 253–258, 1968.
- CORRADO, A. P.; NETO, F. R.; ANTONIO, A. The mechanism of the hypertensive effect of brazilian scorpion venom (Tityus serrulatus lutz e mello). **Toxicon**, v. 12, n. 2, p. 145–150, 1974.
- COTERO, V. et al. Noninvasive sub-organ ultrasound stimulation for targeted neuromodulation.

- Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08750-9>>.
- CRESPO, M. S. et al. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and Non-TLR routes. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.
- CUPO, P. et al. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 36, n. 1, p. 67–76, 1994.
- CUPO, P. et al. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. **International Journal of Cardiology**, v. 116, n. 1, p. 98–106, 2007.
- CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 642–649, 2015.
- CUPO, P.; HERING, S. E. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 823–830, 2002.
- DAS, MINATI; GANGULY, D. Effect of Prostaglandin E2 on acetylcholine release from some peripheral cholinergic nerve terminals. **European Journal of Pharmacology**, v. 100, p. 41–46, 1984.
- DE OLIVEIRA-MENDES, B. B. R. et al. Inhibition of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase affects venom biodistribution. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, 2019.
- FUKUHARA, Y. D. M. et al. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 49–55, 2003.
- GAROFALO, M. A. R. et al. Effect of acute cold exposure on norpinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 60, n. 3, p. 206–208, 1996.
- GOWDA, R. M.; FOX, J. T.; KHAN, I. A. Cardiogenic shock: Basics and clinical considerations. **International Journal of Cardiology**, v. 123, n. 3, p. 221–228, 2008.
- HERING, S. E. et al. “Reversible cardiomyopathy” in patients with severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*: Evolution of enzymatic, electrocardiographic and echocardiographic alterations. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 13, n. 2, p. 173–182, 1993.
- ISBISTER, G. K.; SALUBA BAWASKAR, H. Scorpion Envenomation. **N Engl J Med**, v. 371, p. 457–63, 2014.
- JENKINS, C. M.; CEDARS, A.; GROSS, R. W. Eicosanoid signalling pathways in the heart. **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 2, p. 240–249, 2009.
- KHATTABI, A. et al. Classification of clinical consequences of scorpion stings: Consensus

- development. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 7, p. 364–369, 2011.
- KOWLURU, R. A. et al. Interleukin-1 β and mitochondria damage, and the development of diabetic retinopathy. **Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics**, v. 4, n. 1–2, p. 3–9, 2011.
- KUMAR, L. et al. Autopsy diagnosis of a death due to scorpion stinging - A case report. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 19, n. 8, p. 494–496, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2012.02.028>>.
- LINSSEN, M. C. J. G. et al. Production of arachidonic acid metabolites in adult rat cardiac myocytes, endothelial cells, and fibroblast-like cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 264, n. 3 33-3, p. 973–982, 1993.
- LONG, N. C. et al. Intraperitoneal injections of prostaglandin E2 attenuate hyperthermia induced by restraint or interleukin-1 in rats. **Journal of Physiology**, v. 444, p. 363–373, 1991.
- MAGALHÃES, M. M. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. **Toxicon**, v. 37, n. 8, p. 1155–1164, 1999.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptores and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 135–145, 2001.
- MENDEZ, M.; LAPOINTE, M. C. Trophic effects of the cyclooxygenase-2 product prostaglandin E2 in cardiac myocytes. **Hypertension**, v. 39, n. 2 II, p. 382–388, 2002.
- MIRANDA, C. H. et al. The first description of cardiac magnetic resonance findings in a severe scorpion envenomation: Is it a stress-induced (Takotsubo) cardiomyopathy like? **American Journal of Emergency Medicine**, v. 33, n. 6, p. 862.e5-862.e7, 2015.
- MULHOLLAND, M. W.; SIMEONE, D. M. Prostaglandin E2 stimulation of acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus neurons. **The American Journal of Surgery**, v. 166, n. 5, p. 552–555, 1993.
- NEVIERE, R. et al. Abnormal mitochondrial cAMP/PKA signaling is involved in sepsis-induced mitochondrial and myocardial dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.
- PEIRÓ, C. et al. IL-1 β inhibition in cardiovascular complications associated to diabetes mellitus. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–13, 2017.
- PEREIRA, P. A. T. et al. Prostaglandins d2 and e2 have opposite effects on alveolar macrophages infected with histoplasma capsulatum. **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 2, p. 195–206, 2018.
- PETRICEVICH, V. L. Effect of Tityus serrulatus venom on cytokine production and the activity of

- murine macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 23–31, 2002.
- PETRICEVICH, V. L. et al. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 666–675, 2007.
- PETRICEVICH, V. L. et al. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 154, n. 3, p. 415–423, 2008.
- PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 1, p. 39–49, 2005.
- PIMENTA, R. J. G. et al. Selected to survive and kill: *Tityus serrulatus*, the Brazilian yellow scorpion. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–10, 2019.
- PORTER, K. E.; TURNER, N. A. Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 123, n. 2, p. 255–278, 2009.
- PUCCA, M. B. et al. *Tityus serrulatus* venom – A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272–284, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.015>>.
- PUCCA, M. B. et al. Immunosuppressive evidence of *Tityus serrulatus* toxins Ts6 and Ts15 : insights of a novel K⁺ channel pattern in T cells. p. 240–250, 2015b.
- RECKZIEGEL, G. C.; LAERTE, V.; JR, P. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 46, p. 1–8, 2014.
- REIS, M. B. et al. Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. **Toxicon**, v. 167, p. 174–179, jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010119303940>>.
- REVELO, M. P. et al. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1119–1125, 1996.
- RODRIGUES, F. L. et al. Toll-like receptor 9 plays a key role in the autonomic cardiac and baroreflex control of arterial pressure. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 8, p. R714–R723, 2015.
- ROSSI, M. A.; FERREIRA, A. L.; M., S. J. C. Catecholamine-Depleting Effect of Brazilian Scorpion (*Tityus serrulatus*) Venom on Adrenergic Nerves of the Rat Atrioventricular Valves Physio-pharmacological. **Specialia**, v. 30/5, n. 1969, p. 513–514, 1974.
- SANDANGER, Ø. et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 99, n. 1, p. 164–174, 2013.
- SANTANA, G. C. et al. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-

- linked immunosorbent assay in the rat. **Toxicon**, v. 34, n. 9, p. 1063–1066, 1996.
- SORGI, C. A. et al. Comprehensive monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. **Scientific Data**, v. 5, n. 180167, p. 1–12, 2018.
- SZEKELY, Y.; ARBEL, Y. A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today? **Cardiology and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 25–44, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40119-018-0104-3>>.
- TEIXEIRA, A. L. et al. Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 703–709, 2001a.
- TEIXEIRA, A. L. et al. Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 703–709, 2001b.
- TOLDO, S.; VAN TASSELL, B. W.; ABBATE, A. Interleukin-1 Blockade in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure: Getting Closer and Closer. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 2, n. 4, p. 431–433, 2017.
- TURNER, N. A. Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 94, p. 189–200, 2016.
- YATANI, A. et al. Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 254, n. 3, 1988.
- ZACCOLO, M. CAMP signal transduction in the heart: Understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 1, p. 50–60, 2009.
- ZHANG, W. et al. Cardiac Fibroblasts Contribute to Myocardial Dysfunction in Mice with Sepsis: The role of NLRP3 inflammasome activation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- ZOCCAL, K. F. et al. Tityus serrulatus venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, n. 7–8, p. 1101–1108, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.017>>.
- ZOCCAL, K. F. et al. Ts6 and Ts2 from Tityus serrulatus venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.002>>.
- ZOCCAL, K. F. et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from Tityus serrulatus to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- ZOCCAL, K. F. et al. PPAR- γ activation by Tityus serrulatus venom regulates lipid body formation and

- lipid mediator production. **Toxicon**, v. 93, p. 90–97, 2015.
- ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality TL - 7. **Nature Communications**, v. 7VN-re, p. 10760, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10760>>.
- ZOCCAL, K. F. et al. CD36 shunts eicosanoid metabolism to repress CD14 Licensed interleukin-1 β release and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, p. 1–16, 2018a.
- ZOCCAL, K. F. et al. CD36 Shunts Eicosanoid Metabolism to Repress CD14 Licensed Interleukin-1 β Release and Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 890, 27 abr. 2018b. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00890/full>>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- ZOCCAL, K. F. et al. EP80317 Restrains Inflammation and Mortality Caused by Scorpion Envenomation in Mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 171, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30886580>>. Acesso em: 2 jul. 2019.

Anexos

Anexo I – Estratégias de *gate* utilizadas nos experimentos de citometria de fluxo.

Figura 23. Estratégia de *gate* para citometria de fluxo. (a) Gráficos de contorno mostram hierarquicamente as restrições de citometria de fluxo utilizadas para análise de FSC-H/FSC-A, SSC-A/FSC-A seguida de CD45⁺Ly6G⁺ (neutrófilos) e CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺ (macrófagos). (b) Os gráficos de contornos mostram dados de citómetro de fluxo representativos da hierarquia de *gates* para análise de FSC-H/FSC-A, SSC-A/FSC-A seguida de CD31⁻PDGFR⁺TLR2⁺TLR4⁺CD14⁺ (fibroblastos cardíacos).

Anexo II – Comitê de Ética no Uso de Animais da FCFRP-USP

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

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*", registrada sob nº 16.1.1081.60.5, sob a responsabilidade de Mouzarlem Barros dos Reis e Lúcia Helena Faccioli, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião do dia 04/09/2018.

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

Colaboradores: Karina Furlani Zoccal.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica				
Vigência da Autorização	18/09/2017 a 04/09/2020				
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. isog. C57BL/6 // C57BL6	Cam. isog. 129sv	CK 5LO - /-	CK: CD14 ^{+/+} ; TLR2 ^{+/+} ; TLR4 ^{+/+} ; Caspase 1/11 ^{+/+} ; ASC ^{+/+} ; NLRP3; IL1 ^{+/+}	CK CD36 ^{+/+}
Nº de animais	200//250	40	40	20 de cada (total: 140)	20
Peso/Idade	1-2 dias//16-22g 6-8 sem	16-22g/ 6-8 sem	16-22g/ 6-8 sem	16-22g/ 6-8 sem	16-22g/ 6-8 sem
Sexo	Ambos	Ambos	Ambos	Ambos	Ambos
Origem	Biot. Central PUSP RP	Biot. I FCFRP	Biot. I FCFRP	Biot. Animais especiais FMRP	Biot. UNIFESP

Ribeirão Preto, 17 de setembro de 2018.

Ana Patrícia Vatsuda Natsuf
 Coordenadora da CEUA-FCFRP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela peçonha do escorpião Tityus serrulatus*”, registrado com o número **002/2018-1**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de outubro de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 30 camundongos C57Bl/6 machos pesando 20g oriundos do CEMIB/UNICAMP. Vigência da autorização: 29/10/2018 a 31/03/2020.

We certify that the Protocol nº 002/2018-1, entitled “*Investigation of cardiac changes that occur in poisoning by Tityus serrulatus scorpion venom*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/29/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 30 male C57Bl/6 mice weighing 20g from CEMIB/UNICAMP. This certificate is valid until 03/31/2020.

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AB6D80A

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	AB6D80A
Usuário:	Lúcia Helena Faccioli
CPF/CNPJ:	821.926.268-00
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espèce

Tityus serrulatus

Título da Atividade: **Investigação sobre alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***

Equipe

Lúcia Helena Faccioli
Reitoria da Universidade de São Paulo

Mouzarillem Barros dos Reis
Universidade de São Paulo

Parceiras Nacionais

61.821.344/0001-56 / Instituto Butantan

Data do Cadastro: 26/06/2018 11:01:20

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:10 de 26/08/2019.

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo V – Artigos publicados durante o doutorado

Reis MB, Pereira PAT, Caetano GF, Leite MN, Galvão AF, Paula-Silva FWG, et al. (2017) Lipoxin A₄ encapsulated in PLGA microparticles accelerates wound healing of skin ulcers. PLoS ONE 12(7): e0182381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182381>

ABSTRACT

Lipoxin A₄ (LXA₄) is involved in the resolution of inflammation and wound healing; however, it is extremely unstable. Thus, to preserve its biological activities and confer stability, we encapsulated LXA₄ in poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) microparticles (LXA₄-MS) and assessed its application in treating dorsal rat skin lesions. Ulcers were sealed with fibrin adhesive and treated with either LXA₄-MS, unloaded microparticles (Un-MS), soluble LXA₄, or PBS/glue (vehicle). All groups were compared at 0, 2, 7, and 14 days post-lesions. Our results revealed that LXA₄-MS accelerated wound healing from day 7 and reduced initial ulcer diameters by 80%. Soluble LXA₄, Un-MS, or PBS closed wounds by 60%, 45%, and 39%, respectively. LXA₄-MS reduced IL-1 β and TNF- α , but increased TGF- β , collagen deposition, and the number of blood vessels. Compared to other treatments, LXA₄-MS reduced inflammatory cell numbers, myeloperoxidase (MPO) concentration, and metalloproteinase-8 (*MMP8*) mRNA in scar tissue, indicating decreased neutrophil chemotaxis. In addition, LXA₄-MS treatment increased macrophages and IL-4, suggesting a positive impact on wound healing. Finally, we demonstrated that WRW4, a selective LXA₄ receptor (ALX) antagonist, reversed healing by 50%, indicating that LXA₄ must interact with ALX to induce wound healing. Our results show that LXA₄-MS could be used as a pharmaceutical formulation for the treatment of skin ulcers.

Reis MB, Zoccal KF, Gardinassi LG, Faccioli LH. (2019) Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. *Toxicon* (167): 174-179. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.06.219>.

ABSTRACT

Scorpion envenomation results in a wide range of clinical manifestations that are mostly attributed to the activation of the autonomic nervous system by venom toxins. In fact, sympathetic and parasympathetic disturbances play important roles during poisoning. However, scorpion venom also induces a complex hyperinflammatory state that occurs parallel to systemic inflammatory response syndrome and acute sepsis. After a scorpion sting, innate immune cells are exposed to the venom molecules, which bind to pattern recognition receptors and activate pro-inflammatory pathways that contribute toward the promotion of severe symptoms, such as pulmonary edema, and eventually lead to death. In this review, we highlight studies that pointed out inflammation as a major pathological facet of scorpion envenomation, so as to provide novel targets to improve therapeutics for scorpionism.

Pereira PAT, Bitencourt CS, **Reis MB**, Frantz FG, Sorgi CA, Souza COS, Silva CL, Gardinassi LG, Faccioli LH (2019). Immunomodulatory activity of hyaluronidase is associated with metabolic adaptations during acute inflammation. *Inflammation Research*, *In Press*.

Objective and design: Investigate survival outcomes, and immunological and metabolomic effects of hyaluronidase (Hz) treatment during mouse models of acute inflammation and sepsis.

Methods: Survival of C57Bl/6 mice was monitored after lethal challenge with lipopolysaccharide (LPS) or cecal and ligation puncture (CLP)-induced sepsis and treated with Hz or saline. Mice were also challenged with LPS and treated with Hz for leukocyte counting, cytokine quantification and determination of metabolomic profiles in the peritoneal fluid.

Results: Hz treatment improved survival outcomes after lethal challenge with LPS or CLP-induced sepsis. LPS challenge promoted acute neutrophil accumulation and production of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in the peritoneum, whereas Hz treatment suppressed neutrophil infiltration and cytokine production. We further characterized the metabolomic alterations caused by LPS challenge, which predicted activity of metabolic pathways related to fatty acids and eicosanoids. Hz treatment had a profound effect over the metabolic response, reflected by reductions of the relative levels of fatty acids.

Conclusion: Collectively, these data demonstrate that Hz treatment is associated with metabolic reprogramming of pathways that sustain the inflammatory response.