Ceila Maria Sant'Ana Malaque

**Estudo da ação do veneno de *Tityus serrulatus* sobre a
expressão de transportadores de sódio e água em epitélio
alveolar de rato**

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

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Profa. Dra. Lúcia da Conceição
Andrade

São Paulo
2012

Ceila Maria Sant'Ana Malaque

**Estudo da ação do veneno de *Tityus serrulatus* sobre a
expressão de transportadores de sódio e água em epitélio
alveolar de rato**

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

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Profa. Dra. Lúcia da Conceição
Andrade

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Malaque, Ceila Maria Sant'Ana

Estudo da ação do veneno de *Tityus serrulatus* sobre a expressão de transportadores de sódio e água em epitélio alveolar de rato / Ceila Maria Sant'Ana Malaque. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Lúcia da Conceição Andrade.

Descritores: 1.Venenos de escorpião 2.Edema pulmonar 3.*Clearance* alveolar 4.Citocinas 5.*Toll-like receptor* 6.Ratos

USP/FM/DBD-155/12

Aos meus pais

Agradecimentos

A Deus, o manancial da vida (Sl. 36:9).

À minha família, meu porto seguro.

À Prof. Dra. Lúcia Andrade, pelo apoio, estímulo e generosidade, sem os quais não teríamos iniciado essa “empreitada”. E acima de tudo, obrigada pela amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Seguro, por novamente abrir seu laboratório para que, agora, eu pudesse fazer o doutorado e pelas sugestões que muito contribuíram com este trabalho.

A Talita, Carol, Rildo e Helô por todo o trabalho que fizeram, pelo que me ensinaram, pela paciência que tiveram e pela boa companhia que foram no LIM12.

À Dra. Fabíola Bernardi do Departamento de Patologia da FMUSP, pelo auxílio e colaboração nas avaliações das lâminas dos pulmões.

À Tatiana Lanças pela gentileza em nos ajudar com os programas de análises para imunoistoquímica.

A Angela e Cristina do Laboratório de Imunoistoquímica da FMUSP, pelo auxílio, atenção e disposição em nos ajudar.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen e à Meire Hiyane do Laboratório de Imunobiologia dos Transplantes (ICB/USP)): por disponibilizar seu laboratório para as dosagens de citocinas e pela realização das mesmas, respectivamente.

A Eloá e Nivaldo por nos dar o suporte necessário nas questões administrativas.

À Ciça que cuidou dos animais da pesquisa, me ensinou e muito me ajudou a tratar com os pequenos.

A amigo Marcelo Santoro pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Sessão de Veneno do Instituto Butantan pela doação do veneno de *T. serrulatus*.

Ao Dr. R James Turner que gentilmente nos cedeu os anticorpos anti-NKCC1.

A Capes, CNPq e Fapesp pelo suporte à realização da pesquisa.

*“... no hay cuestiones pequeñas, las que lo parecen
son cuestiones grandes no comprendidas”
(Santiago Ramón Y Cajal)*

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Envenenamento escorpiônico.....	02
1.2	Edema pulmonar e “clearance” do fluido alveolar (CFA).....	06
2	OBJETIVOS.....	14
3	MÉTODOS.....	16
3.1	Envenenamento.....	17
3.2	Análise bioquímica.....	18
3.3	Western blotting para estudo das proteínas transportadoras de sódio e água do epitélio pulmonar e Toll-like receptor 4.....	18
3.4	Avaliação do “stress” oxidativo.....	19
3.5	Imunoistoquímica.....	20
3.6	Análise de citocinas no plasma.....	21
3.7	Análise estatística.....	21
4	RESULTADOS.....	23
4.1	Envenenamento.....	24
4.2.1	Análise bioquímica.....	28
4.2.2	Análise bioquímica em ratos que receberam apenas dexametasona.....	39
4.3	Análise da expressão de proteínas transportadoras de sódio e água.....	

		48
4.4	“Stress” oxidativo.....	54
4.5	TLR4.....	55
4.6	NF-κB.....	56
4.7	Infiltração de macrófagos no tecido alveolar.....	58
4.8	Infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar.....	60
4.9	Dosagem de citocinas no plasma.....	62
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÕES.....	74
7	REFERÊNCIAS.....	76

Lista de abreviaturas

AQP5:	aquaporina 5
AST:	aspartato aminotransferase
ATC:	ácido tricloroacético
ATI :	células epiteliais alveolares tipo I
ATII:	células epiteliais alveolares do tipo II
CFA :	“clearance” de fluido alveolar
CPK-MB:	isoenzima MB da creatinofosfoquinase
CPK:	creatinofosfoquinase
DAB:	3,3-diaminobenzidina DAB
DHL:	desidrogenase-lática
EAP:	edema agudo de pulmão
ENaC:	epithelial Na ⁺ channel (canal epitelial de sódio)
ev:	endovenosa
GM-CSF:	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (fator estimulador de colônia de macrófago e granulócito)
IC:	insuficiência cardíaca
IL:	interleucina
INF-γ:	interferon γ
ip:	intraperitoneal
LPA:	lesão pulmonar aguda
Na ⁺ /H ⁺ :	transportador Na/H
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase:	sódio-potássio-adenosina trifosfatase
NF-κB:	nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B)
NKCC:	Na-K-Cl <u>cotransporter (cotransportador sódio-potássio-cloro)</u>
PAF:	platelet-activating fator (fator ativador de plaquetas)
RNA _m :	RNA mensageiro (ácido ribonucleico mensageiro)
SARA :	síndrome da angustia respiratória aguda
SNA:	sistema nervoso autônomo
TBARS:	thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TLR:	toll-like receptor (receptor Toll-like)
TNF- α :	tumor necrosis fator α (fator de necrose tumoral α)
TsTX-1:	tityustoxina 1
VEGF:	vascular endothelial growth factor (fator de crescimento do endotélio vascular)
WB:	western blotting

Lista de figuras

Figura 1 -	Representação esquemática da barreira alvéolo-capilar e dos canais e transportadores envolvidos no transporte de íons e fluidos através das células alveolares tipo I (ATI) e tipo II (ATII)	07
Figura 2 -	Valores das dosagens de sódio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e veneno+dexametasona	31
Figura 3 -	Média $\pm$ erro padrão dos valores de sódio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e veneno+dexametasona	31
Figura 4 -	Valores das dosagens de potássio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e veneno+dexametasona	32
Figura 5 -	Média $\pm$ erro padrão dos valores de potássio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados	32
Figura 6 -	Valores das dosagens de ureia obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e veneno+dexametasona	33
Figura 7	Média $\pm$ erro padrão dos valores de ureia obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e veneno+dexametasona	33
Figura 8 -	Valores das dosagens de creatinina obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e veneno+dexametasona	34
Figura 9 -	Média $\pm$ erro padrão dos valores de creatinina obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados	34

Figura 10 -	Valores das dosagens de CPK obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados	35
Figura 11 -	Média $\pm$ erro padrão dos valores de CPK obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados	35
Figura 12 -	Valores das dosagens de DHL obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados	36
Figura 13 -	Média $\pm$ erro padrão dos valores de DHL obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados	36
Figura 14 -	Valores das dosagens de amilase obtidos do plasma de ratos dos três grupos estudados	37
Figura 15 -	Média $\pm$ erro padrão dos valores de amilase obtidos no plasma de ratos dos três grupos estudado	37
Figura 16 -	Valores das dosagens de troponina obtidos do plasma de ratos dos três grupos estudados	38
Figura 17 -	Média $\pm$ erro padrão dos valores de troponina obtidos no plasma de ratos dos três grupos estudados	38
Figura 18 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de sódio obtidos do plasma dos animais estudados	40
Figura 19 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de potássio obtidos do plasma dos animais estudados	41
Figura 20 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de ureia obtidos do plasma dos animais estudados	42
Figura 21 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de creatinina obtidos do plasma dos animais estudados	43
Figura 22 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de	44

CPK obtidos do plasma dos animais estudados

Figura 23 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de DHL obtidos do plasma dos animais estudados	45
Figura 24 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de amilase obtidos do plasma dos animais estudados	46
Figura 25 -	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de troponina obtidos do plasma dos animais estudados	47
Figura 26 -	Imunoblot semiquantitativo de proteínas de membranas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica apresentando valores individuais e média $\pm$ erro padrão. B: imunoblot utilizando anticorpo anti- α -ENaC, revelando a banda de 90 kDa	49
Figura 27 -	Imunoblot semiquantitativo de proteínas de membranas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica apresentando valores individuais e média $\pm$ erro padrão. B: imunoblot utilizando anticorpo anti-NKCC1	50
Figura 28	Imunoblot semiquantitativo de frações de membranas preparadas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica, apresentando valores individuais e média $\pm$ erro padrão. B: imunoblot utilizando anticorpo anti- α_1 -Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	51
Figura 29	Imunoblot semiquantitativo de frações de membranas preparadas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica, apresentando valores individuais e média $\pm$ erro padrão. B: imunoblot utilizando anticorpo	52

anti-AQP5

Figura 30	Corte histológico de parênquima pulmonar de ratos, onde se observa a localização de AQP5, uma hora após a injeção de veneno de <i>T. serrulatus</i>	53
Figura 31	Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de TBARS obtidos do plasma dos animais estudados	54
Figura 32	Imunoblot semiquantitativo de frações de membranas preparadas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica, apresentando valores individuais e média $\pm$ erro padrão. B: imunoblot utilizando anticorpo anti-TLR4	55
Figura 33a -	Gráficos apresentam valores individuais e média $\pm$ erro padrão do conteúdo de células NF- κ B no tecido alveolar dos animais, por grupo avaliado	56
Figura 33b -	Cortes histológicos de parênquima pulmonar de ratos onde se observa a localização de NF- κ B, uma hora após a injeção de veneno de <i>T. serrulatus</i>	57
Figura 34a -	Gráficos mostram o número de células CD68+ em tecido alveolar, com os valores individuais de cada animal e média $\pm$ erro padrão, segundo o grupo estudado	58
Figura 34b -	Cortes histológicos de parênquima pulmonar de ratos onde se observa infiltração de células CD68+ uma hora após a injeção de veneno de <i>T. serrulatus</i> , nos grupos estudados	59
Figura 35a	Gráficos mostram o número de neutrófilos em tecido	60

alveolar, com os valores individuais de cada animal e a média $\pm$ erro padrão, segundo o grupo estudado

- Figura 35b - Cortes histológico de parênquima pulmonar de ratos, 61
apresentando infiltração de neutrófilos uma hora após a
injeção de veneno de *T. serrulatus*, nos grupos
estudados
- Figura 36 - Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de 62
IL-6 observados em plasma dos animais estudados,
segundo o grupo
- Figura 37 - Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de 63
TNF- α plasmático detectados em ratos, segundo o
grupo estudado
- Figura 38 - Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de 64
IL-10 observado em plasma dos animais estudo,
segundo o grupo

Lista de tabelas

- Tabela 1 - Manifestações sistêmicas observadas em ratos que 25
receberam injeção via ip de veneno de *T. serrulatus*,

dexametasona e veneno e em ratos controle

Tabela 2 - Resultado dos testes laboratoriais realizados em ratos 29
que receberam injeção via ip de veneno de *T. serrulatus*,
dexametasona e veneno e em ratos controle

Resumo

Malaque CMS. Estudo da ação do veneno de *Tityus serrulatus* sobre a expressão de transportadores de sódio e água em epitélio alveolar de rato [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

Acidentes escorpiônicos podem evoluir com edema pulmonar de origem cardiogênica e não cardiogênica. O “clearance” de edema pulmonar está relacionado principalmente ao transporte ativo de sódio do espaço alveolar para o interstício. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do veneno de *Tityus serrulatus* e da dexametasona sobre a expressão dos transportadores de sódio e água e do TLR4 em pulmão de ratos. Foram utilizados ratos Wistar, divididos em três grupos: controle (salina); grupo Vn, que recebeu o veneno de *T. serrulatus* (3.8 mg/kg) por via intraperitoneal (ip), e o grupo Dx+Vn, que recebeu dexametasona (2.0 mg/kg) por via ip, uma hora antes da injeção do veneno. Os experimentos foram realizados uma hora após a injeção do veneno. Foram realizadas análise bioquímica e dosagens de citocinas no plasma. Nos pulmões foram estudados a expressão de α -ENaC, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, NKCC1, AQP-5 e TLR4 através de western blotting, e a expressão do NF- κ B e infiltração de células CD68⁺ (monócitos/macrófagos) e neutrófilos, através de imunoistoquímica. O veneno de *T. serrulatus* diminuiu a expressão pulmonar de α -ENaC e AQP-5, enquanto aumentou a expressão do NKCC1. A dexametasona preveniu os efeitos do veneno sobre a expressão da α -ENaC e NKCC1, mas não da AQP5. Não foi observada alteração da expressão da α_1 - $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase. A expressão do TLR4 foi maior nos animais envenenados que nos grupos Cont e Dx+Vn. Os níveis plasmáticos de IL-6, IL-10 e TNF- α estavam aumentados nos grupos Vn e Dx+Vn em relação ao controle. O infiltrado de células CD68⁺ foi maior no grupo Vn. A expressão de NF- κ B e o infiltrado de neutrófilos no tecido pulmonar foram semelhantes nos três grupos avaliados. Os resultados encontrados sugerem que o veneno de *T. serrulatus* tem efeito sobre as proteínas transportadoras de sódio em células do epitélio alveolar e também sobre a expressão do TLR4 em pulmão; a dexametasona pode regular essas ações.

Descritores: Venenos de escorpião, Edema pulmonar, "Clearance" alveolar, Citocinas, "Toll-like receptor", Ratos

Summary

Malaque CMS. Effect of *Tityus serrulatus* venom on sodium and water transporters in rat alveolar epithelium [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

Scorpion envenomation can cause cardiogenic and noncardiogenic pulmonary edema. Pulmonary edema clearance is largely related to active Na⁺ transport out of the alveoli, rather than to reversal of Starling forces. Our objective was determine the effects of *Tityus serrulatus* venom and dexamethasone on the pulmonary expression of sodium and water transporters, and Toll-like receptor 4. Wistar rats were divided into groups and injected intraperitoneally: control (saline only); venom (*T. serrulatus* venom—3.8 mg/kg body weight); and dexamethasone+venom (dexamethasone—2.0 mg/kg body weight—60 min before venom inoculation). At 60 min after venom inoculation, interleukin-6 and -10, together with tumor necrosis factor alpha, were analyzed in plasma. In lungs, we determined expression of the epithelial sodium channel alpha subunit; Na,K-ATPase alpha 1 subunit; Na-K-2Cl cotransporter, NKCC1; aquaporin 5; Toll-like receptor 4 (by Western blotting); and nuclear factor-kappa B. We determined CD68 and neutrophil counts by immunohistochemistry. In venom group lungs, the epithelial sodium channel alpha subunit and aquaporin 5 were markedly downregulated, whereas NKCC1 was elevated, although the Na,K-ATPase alpha 1 subunit was unaffected. Dexamethasone protected the epithelial sodium channel alpha subunit, NKCC1, and Toll-like receptor 4 but not aquaporin 5. Serum interleukin 6, interleukin 10, and tumor necrosis factor alpha were elevated in both groups, as was CD68 expression. Neutrophil counts and nuclear factor-kappa B expression were comparable across groups. Our data show that *T. serrulatus* venom alters sodium transport in alveolar epithelial cells and increases Toll-like receptor 4 expression. Dexamethasone appears to partially protect against those effects.

Descriptors: Scorpion venoms, Lung edema, Clearance alveolar, Cytokines, Toll-like receptor 4, Rats

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Envenenamento escorpiônico

No Brasil, têm sido registrados atualmente cerca de 120.000 acidentes por animais peçonhentos, a maioria causada por escorpiões. Há cerca de dez anos vem se observando o aumento das notificações de escorpionismo em todo Brasil, o que pode ser decorrente de um aumento real de acidentes ou de melhora no sistema de notificações no país. Em 2010 foram registrados cerca de 51.000 acidentes escorpiônicos⁽¹⁾.

Os escorpiões considerados de importância médica no Brasil pertencem ao gênero *Tityus* e as principais espécies causadoras de acidentes variam de acordo com a região do país como *T. obscurus* e *T. metuendus* na região Norte, *T. stigmurus* na região Nordeste e *T. serrulatus* e *T. bahiensis* na região Sudeste⁽²⁾.

A maioria dos acidentes é registrada nas regiões Sudeste e Nordeste, principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco e São Paulo. São acidentes que predominam em regiões urbanas⁽¹⁾.

A gravidade destes acidentes está relacionada à faixa etária do paciente bem como à espécie de escorpião. Na faixa de zero a quatro anos a frequência de casos com manifestações sistêmicas (classificados como moderados ou graves) pode alcançar 30%. O número de óbitos registrados anualmente tem sido cerca de 80 a 100 óbitos/ano, com letalidade maior em crianças. Em 2010, a letalidade observada na faixa etária de um a nove anos foi de 0,7%, enquanto a letalidade geral foi de 0,2%⁽¹⁾. Além disso, observa-se que acidentes causados *T. serrulatus* apresentam maior gravidade em relação ao *T. bahiensis*⁽³⁾.

O veneno de *T. serrulatus* contém toxinas com atividade sobre canais de sódio e potássio. A maioria dos efeitos farmacológicos induzidos pela toxina escorpiônica é devido a sua ligação em dois diferentes sítios na superfície extracelular do canal de sódio, levando ao retardo da inativação

do canal de Na^+ decorrente da ação da α -toxina ou estimulando sua ativação pela ação da β -toxina. Em consequência, há despolarização de membranas das células excitáveis do organismo e liberação maciça de catecolaminas e acetilcolina pelas terminações nervosas pós-ganglionares dos sistemas simpático e parassimpático e da medula da suprarrenal. As manifestações sistêmicas observadas nos envenenamentos são decorrentes principalmente da ativação do sistema nervoso autônomo (SNA)^(4, 5).

Após a picada, em geral o paciente relata dor local, imediata e muitas vezes de forte intensidade. Pode ser observado no local eritema e sudorese. Alguns casos, especialmente em crianças, evoluem com manifestações sistêmicas como agitação, sonolência, sudorese, náuseas, vômitos, hipertensão arterial, taquicardia, taquipnéia, sialorréia, tremores, espasmos musculares, bradicardia, bradipnéia, arritmias cardíaca, edema agudo de pulmão (EAP), insuficiência cardíaca (IC) e choque. Na região Norte do Brasil, além das manifestações sistêmicas descritas, tem sido relatado também sensação de choque elétrico, mioclonia, dismetria, disartria, marcha atáxia. Esse quadro clínico é associado à picada por *T. obscurus*⁽⁶⁾. As manifestações sistêmicas também costumam iniciar-se precocemente, de forma que nas primeiras duas a três horas a gravidade do acidente está definida^(7, 8).

Os óbitos que ocorrem no escorpionismo estão relacionados às alterações cardiovasculares observadas nos casos graves, com insuficiência cardíaca e edema agudo de pulmão. O edema de pulmão é de origem cardiogênica e não cardiogênica. O envolvimento cardíaco no envenenamento escorpiônico, representado pela disfunção do ventrículo esquerdo, é demonstrado pelas manifestações clínicas, pelo aumento de enzimas como desidrogenase láctica (DHL), creatinofosfoquinase (CPK), da isoenzima MB da creatinofosfoquinase (CPK-MB), da aspartato aminotransferase (AST), e de proteína como Troponina, e por alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas^(8, 9). Estudos da hemodinâmica de pacientes picados por escorpiões de outros gêneros e que evoluíram com edema agudo de pulmão mostram taquicardia, pressão arterial normal ou

diminuída, aumento da pressão capilar pulmonar, resistência vascular sistêmica normal e comprometimento da função sistólica de ventrículo esquerdo^(10, 11). O acometimento cardíaco caracteriza-se por alterações sugestivas de miocardite e/ou infarto e é provavelmente decorrente do excesso de catecolaminas gerado pela ativação do SNA e pode ser atribuída á hipóxia relativa que ocorre devido ao aumento da frequência cardíaca, ao espasmo coronariano e vasoconstrição da microcirculação com consequente isquemia cardíaca. Cupo et al.⁽¹²⁾ observaram forte relação entre a disfunção ventricular sistólica e alteração da perfusão miocárdica no envenenamento escorpiônico grave, sugerindo a participação de isquemia miocárdica transitória no mecanismo da insuficiência cardíaca. Necropsia de criança que evoluiu a óbito cerca de 6 horas após picada de *T. serrulatus* mostra múltiplos focos de miocitólise em miocárdio. Este tipo de necrose tem sido associado a grande quantidade de catecolaminas na circulação⁽¹³⁾. As alterações cardíacas também podem ser decorrentes de um efeito direto da toxina ou da ação de citocinas que, de forma semelhante ao que ocorre no choque séptico, podem exercer efeito depressor sobre o miocárdio^(8, 13-19). Estudos experimentais e clínicos evidenciam que mediadores da resposta inflamatória sistêmica têm um importante papel no envenenamento escorpiônico grave. O edema pulmonar desencadeado por veneno de *T. serrulatus* em ratos está associado à ativação da cascata inflamatória levando à liberação de mediadores derivados de lípidos como o fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrienos e prostaglandinas, relacionados à permeabilidade vascular⁽²⁰⁻²⁴⁾. Níveis plasmáticos de citocinas estão elevados em animais e humanos após envenenamento por *T. serrulatus*⁽²⁵⁻²⁸⁾. Camundongos injetados com veneno de *T. serrulatus* por via intraperitoneal apresentam níveis séricos e plasmáticos elevados de interleucina 1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, interferon γ (INF- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-10^(25, 27, 28). Pacientes com manifestações graves após acidente escorpiônico apresentam níveis séricos elevados de IL-6, INF- γ e do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)⁽²⁶⁾. O recrutamento aumentado de leucócitos em pulmões também é

descrito em ratos após injeção de venenos de *T. serrulatus*^(22, 24). Pessini et al.⁽²⁵⁾ observaram que o veneno de *T. serrulatus* pode induzir uma resposta de fase aguda. Camundongos que receberam veneno de *T. serrulatus* ou a tityustoxina 1 (TsTX-1), via intraperitoneal, apresentaram redução de albumina, aumento de proteína C reativa, leucocitose local (peritoneal) e sistêmica, com predomínio de polimorfonucleares. Bertazzi et al.⁽²⁹⁾ sugerem que o sistema complemento esteja envolvido no processo inflamatório induzido pelo veneno de *T. serrulatus* e pode estar relacionado ao edema pulmonar. Os autores observaram um aumento na atividade lítica do sistema complemento em animais envenenados com veneno de *T. serrulatus*, injetado por via intraperitoneal. Houve aumento significativo da atividade da via clássica e via alternativa. O efeito foi bifásico, com picos a 1 e 24 horas após a injeção, para ambas as vias.

Com objetivo de orientar o tratamento, os acidentes escorpiônicos são classificados em leves, quando há apenas alterações no local da picada e moderados ou graves quando, além do quadro local, há manifestações sistêmicas. No Brasil, o antiveneno específico, o Soro Antiescorpiônico ou o Soro Antiaracnídico é indicado apenas para os casos em que há alterações sistêmicas e deve ser associado a medidas sintomáticas e suporte das funções vitais^(7, 30).

Rezende et al.⁽³¹⁾, avaliando pacientes com escorpionismo moderado ou grave observaram que, após 24 horas do uso do antiveneno, a maioria dos sinais e sintomas sistêmicos não estava mais presente ou com estava com uma frequência menor. Entretanto, aqueles pacientes que foram admitidos com EAP permaneciam com o mesmo quadro 24 horas após a administração do antiveneno. Estudo conduzido em crianças picadas por escorpião observou que quando o antiveneno foi administrado à pacientes com dor local, sudorese profusa e vômitos tais manifestações tendiam a desaparecer rapidamente após a soroterapia e os pacientes não desenvolviam manifestações cardiorrespiratórias graves. Entretanto, quando essas manifestações já estavam presentes, não se observava melhora logo após a administração do antiveneno⁽³²⁾.

Considerando a origem multifatorial do escorpionismo grave, mesmo que o veneno seja neutralizado pela soroterapia específica, a melhora clínica pode não ocorrer apenas com a administração do antiveneno, sendo necessárias medidas de suporte⁽³²⁾. É importante que se conheça os mecanismos envolvidos na patogênese do edema pulmonar, bem como aqueles relacionados à sua resolução para que se busque medidas mais eficientes para o tratamento das complicações deste agravo.

1.1 Edema pulmonar e “clearance” do fluido alveolar (CFA)

O transporte de líquido nos pulmões é essencial nos processos fisiológicos do pulmão, bem como na resolução de processos patológicos. O edema pulmonar é uma condição que resulta de um desequilíbrio entre forças que dirigem fluidos dentro do espaço aéreo e mecanismos biológicos para a sua remoção. Apesar de, por muitos anos, as forças de Starling (pressões hidrostática e oncótica) terem sido consideradas como tendo o papel mais importante para manter o espaço alveolar livre de fluidos, há evidências de que o transporte ativo de íons através do epitélio alveolar cria um gradiente osmótico que leva a reabsorção de água nos pulmões durante o período perinatal e em adultos⁽³³⁻³⁶⁾.

Independente da causa, uma vez estabelecido o edema pulmonar, o “clearance” de fluidos através do epitélio alveolar depende do transporte ativo de sódio através do epitélio alveolar via canais de sódio amiloride-sensível (ENaC), presentes na região apical e da Na,K-adenosina trifosfatase ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$), presente na região basolateral. Este fluxo de sódio produz um gradiente osmótico transepitelial, resultando no movimento passivo de água do espaço aéreo para o interstício alveolar^(33-35, 37).

Ware e Matthay⁽³⁸⁾ em estudo realizado em pacientes com lesão pulmonar aguda (LPA) ou síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) observaram que aqueles pacientes que apresentavam um “clearance” de fluido alveolar (CFA) máximo tiveram uma evolução clínica melhor, com menor letalidade e menor tempo de ventilação mecânica.

A superfície interna dos pulmões é revestida por células epiteliais alveolares tipo I (ATI) e células epiteliais alveolares do tipo II (ATII). As células ATI revestem 95% da superfície e as células ATII, 5%. Nos pulmões, como em outras células epiteliais, os

transportadores de íons e outras proteínas de membrana estão distribuídos assimetricamente na superfície das células, conferindo propriedade de transporte vetorial às células epiteliais polarizadas⁽³⁹⁾. As células ATII são responsáveis pela secreção de surfactante assim como do transporte vetorial de sódio, especialmente através dos canais ENaC e $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ^(36, 40). Vários estudos têm demonstrado também um papel das células ATI no transporte vetorial. Essas células expressam aquaporina 5 (AQP5), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e ENaC^(41, 42) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da barreira alvéolo-capilar e dos canais e transportadores envolvidos no transporte de íons e fluidos através das células alveolares tipo I (ATI) e tipo II (ATII)⁽⁴³⁾

A força primária que dirige a reabsorção de fluido do espaço alveolar para o interstício e a circulação pulmonar é o transporte ativo de sódio. O sódio é absorvido na superfície apical do epitélio alveolar pelos canais de sódio amilorida-sensível (ENaC), uma proteína composta de 3 subunidades, α , β e γ , e amilorida-insensível e é subsequentemente bombeado pela $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no lado basolateral. Este processo gera um gradiente osmótico, que dirige um movimento passivo da água do lado apical do epitélio (espaço alveolar) para o lado basolateral (o interstício) por via paracelular e

através dos canais da água, aquaporin-5 (AQP5), que estão localizados nas células ATI^(33, 34, 37).

Estudos demonstram que o CFA é inibido pela amilorida, um inibidor dos canais epiteliais de sódio (ENaC), bem como pelo inibidor da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, ouabain⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. O aumento da expressão de canais ENaC e $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ aumenta o transporte ativo de Na levando a um melhor CFA^(47, 48).

O papel do ENaC no CFA foi confirmado através da geração de camundongo nocaute inativado para subunidades de ENaC. Após a inativação da subunidade $\alpha\text{-ENaC}$, o camundongo recém-nascido desenvolveu insuficiência respiratória e morreu dentro de 40 horas após o nascimento⁽⁴⁹⁾. Em contraste, camundongos nocaute para as subunidades β ou $\gamma\text{-ENaC}$ puderam realizar o “clearance” de fluido pulmonar ao nascimento, entretanto, a uma taxa mais lenta que camundongos normais^(50, 51). Egli et al.⁽⁵²⁾ mostraram que camundongos adultos, que apresentam atividade de ENaC comprometida, desenvolvem edema agudo de pulmão mais severo que animais controles quando tratados com tioureia, uma droga que aumenta a permeabilidade da barreira alvéolo-capilar, ou quando expostos a hiperóxia prolongada. O impacto dos canais de sódio amiloride-sensível nos transporte de sódio em pulmões é espécie dependente. Enquanto a amilorida inibe até 90% do transporte de Na em camundongo, a contribuição do ENaC para o CFA em outras espécies como ratos, coelho e pulmão humano é menor, de 40 a 60%⁽⁵³⁾.

Enquanto a absorção apical de sódio do epitélio alveolar é realizada por vários mecanismo de transporte de sódio (através de canais amiloride-sensível e amiloride-insensível e cotransportadores de sódio), o único transportador que ativamente expelle o sódio das células epiteliais alveolares é a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ é uma proteína

transmembrana expressa na superfície basolateral de muitas células epiteliais de mamíferos. Em um processo que consome ATP, ela mantém o gradiente de sódio e potássio através da membrana plasmática bombeando três íons sódio para fora da célula em troca de dois íons de potássio para dentro da célula. É uma proteína composta por uma subunidade α e β . Ambas as subunidades são necessárias para a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ^(53, 54). O aumento da expressão das subunidades β_1 ou α_2 , aumenta a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ resultando no aumento do CFA em ratos adultos e em células epiteliais alveolares fetais^(47, 55, 56).

A importância dos canais de água do tipo aquaporinas (AQPs) sobre o CFA não está bem definida. Existem pelo menos 13 proteínas transportadoras de água do tipo aquaporina identificadas em tecidos de mamíferos, dentre as quais, pelo menos quatro (AQP1, AQP3, AQP4 e AQP5) são expressas nos pulmões. As AQPs são proteínas hidrofóbicas pequenas (28-31 kDa). A AQP1 é encontrada na membrana plasmática de células endoteliais e em alguns pneumócitos. A AQP3 é expressa em células basais do epitélio de grandes vias aéreas e em nasofaringe. A AQP4 é expressa na superfície da membrana plasmática basolateral em células epiteliais da traquéia, em pequenas e grandes vias aéreas. A AQP5 é expressa na membrana apical das células epiteliais alveolares do tipo I⁽⁵⁷⁻⁶²⁾. As AQP1 e AQP5 parecem apresentar um papel mais importante no movimento osmoticamente direcionado da água através das barreiras alvéolo endotelial e epitelial, respectivamente. Em ratos nocaute para AQP5, a permeabilidade osmótica à água do espaço aéreo para capilares é diminuída em 10 vezes⁽⁶⁰⁾. Apesar de seu papel no transporte de água osmoticamente dirigido nos pulmões, estudos em camundongos com deleção específica para AQP sugerem que as AQPs de pulmões conhecidas têm pouca importância no CFA ou no acúmulo de fluidos em resposta a lesão pulmonar. Apesar da expressão de aquaporinas estar bastante aumentada próximo ao nascimento, camundongos nocaute para AQP1, AQP4 e AQP 5 apresentam a mesma habilidade para realizar o CFA no período perinatal que camundongos controle⁽⁶³⁻⁶⁵⁾. Ma et al.⁽⁶⁰⁾ mostraram

que camundongos nocaute para AQP5 apresentam importante diminuição da permeabilidade osmótica à água, entretanto, nem a absorção de fluido alveolar ativa, nem o acúmulo de água pulmonar dirigido hidrostáticamente apresentam-se comprometidos. Além disso, Song et al.⁽⁶⁵⁾ reportaram que a deleção de AQP1, AQP4 e AQP5 não apresenta efeitos na formação ou no “clearance” de edema pulmonar, mesmo após lesão com hipóxia, tiourea ou instilação de ácido. Esses estudos sugerem que, apesar do seu papel no transporte de água pulmonar dirigido osmoticamente, as aquaporinas não seriam necessárias para o “clearance” fisiológico de água no pulmão ou para o acúmulo de água extra-vascular no pulmão em processos patológicos.

Além dos canais ENaC, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e AQP5, é possível ainda que a expressão do cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC) também tenha um papel na manutenção do edema pulmonar⁽⁶⁶⁾. O cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ é uma classe de proteínas de membrana que transporta sódio, potássio e cloro para dentro e fora das células, de forma eletricamente neutra. Está presente em uma ampla variedade de células e tecidos, incluindo os epitélios de reabsorção e secreção, nervos e células musculares, células endoteliais, fibroblastos e células sanguíneas. O cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ desempenha um papel vital na reabsorção renal de sal e na secreção de sal através das vias aéreas, intestino, glândulas salivares e outros epitélios secretores. Uma importante função do NKCC é a manutenção e regulação do volume celular e de gradientes de íons de células epiteliais e não epiteliais. Normalmente são estimuladas por condições que diminuem o volume celular ou a concentração de cloro. Existem duas isoformas de NKCC, NKCC1 e NKCC2. O NKCC1 está presente em vários tecidos; a maioria dos epitélios que contém NKCC1 são os epitélios secretores, e o cotransportador está localizado na membrana basolateral. Já o NKCC2 é encontrado apenas no rim e está localizado na membrana apical da célula epitelial da alça fina ascendente de Henle e mácula densa. O NKCC1 tem o papel fundamental em manter o volume celular, mediante o fluxo de íons transepitelial em tecidos secretórios. Em células excitáveis esse cotransportador pode regular o gradiente iônico que determina o potencial de

repouso da membrana. O NKCC2 é responsável pela reabsorção de sódio na alça ascendente de Henle⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

Estudos experimentais demonstram que vários estímulos como agonistas beta adrenérgico, citocinas, hormônios glicocorticoide, mineralocorticoide e tireoidiano podem modular o CFA⁽⁷⁰⁻⁷⁶⁾.

Fatores hormonais, como glicocorticóides, aumentam o transporte de fluido através das vias aéreas distais dos pulmões. Barquin et al.⁽⁷⁷⁾, observaram que células ATIII expostas à dexametasona apresentaram um aumento do RNAm da subunidade β_1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase e aumento da expressão de proteínas das subunidades α_1 e β_1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase. Os autores sugerem que a dexametasona regula a expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase possivelmente via mecanismos transcriptional, translacional e pós-translacional. Lazrak et al.⁽⁷⁸⁾, estudando uma linhagem de células de epitélio alveolar humano, A549 (células derivadas de adenocarcinoma pulmonar), observaram que aquelas incubadas com dexametasona apresentavam maiores níveis de RNAm das subunidades β e γ do ENaC e aumento na expressão de proteínas das subunidades β e γ do ENaC. Entretanto, os níveis de RNAm e de proteínas da subunidade α -ENaC permaneceu inalterado. Ratos adultos, que receberam dose única de dexametasona, apresentaram aumento do CFA 48 e 72 horas após, com ação dose dependente. Os animais tratados com dexametasona apresentaram níveis maiores de RNAm das subunidades β e γ do ENaC; os níveis de RNAm da subunidade α deste canal foi semelhante ao controle. Os níveis de RNAm da subunidade α_1 ou β_1 da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase não alteraram nas 72 horas após o tratamento, entretanto os autores observaram um aumento na atividade hidrolítica da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase pulmonar⁽⁷⁰⁾. Por outro lado, Dagenais et al.⁽⁷⁹⁾ relataram aumento da expressão do RNAm da subunidade α , β e γ do canal ENaC em células ATIII de ratos adultos tratadas por até 48 horas com dexametasona. Observaram ainda, um aumento na expressão do RNAm da β_1 - $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, mas não da α_1 - $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase. Güney et al.⁽⁷⁴⁾ reportaram que a expressão do RNA da α_1 - $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase e de α , β e γ -EnaC estava aumentada em células A549, após a exposição destas à dexametasona. Em células A549, Itani et al.⁽⁸⁰⁾ verificaram aumento da expressão de RNAm de α -EnaC 2 horas após estímulo com dexametasona. Folkesson et al.⁽⁷³⁾ observaram que a dexametasona regula o transporte transepitelial de sódio “in vivo”, aumentando o CFA em ratos adultos sob ventilação mecânica. Os animais que receberam previamente a dexametasona apresentaram aumento do CFA em 82%, comparados com ratos controle. Essa ação foi parcialmente inibida pela amilorida, sugerindo que o canal ENaC é estimulado pela dexametasona. Güney et al.⁽⁷⁴⁾ relataram que o pré-tratamento com dexametasona preveniu a inibição do CFA induzido pela hipóxia em ratos. Ben et al.⁽⁸¹⁾ observaram que a expressão do RNAm de AQP3 e AQP5 e a expressão dessas proteínas aumentaram em células epiteliais A549 em resposta ao tratamento com dexametasona.

Em relação ao cotransportador NKCC1 e NKCC2, a atividade de ambas isoformas é inibida por diuréticos de alça como a bumetanida e a furosemida^(68, 82, 83). Alguns estudos sugerem que o efeito benéfico de furosemida na lesão pulmonar aguda pode ser resultado da inibição da NKCC1: cachorros que tiveram lesão pulmonar aguda induzida por ácido linoleico intravenoso e foram submetidos à nefrectomia bilateral apresentaram melhora do “shunt” intrapulmonar com a administração de furosemida⁽⁸⁴⁾. Crianças prematuras mostraram melhor troca gasosa quando foi administrada furosemida na forma de aerossol⁽⁸⁵⁾.

Comellas et al.⁽⁸⁶⁾ mostraram em ratos e cultura de células do epitélio alveolar tipo II que o veneno de *T. serrulatus* diminui o “clearance” de líquido pulmonar, provavelmente através da diminuição da expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase no epitélio alveolar.

Para avaliar a importância dos mecanismos de “clearance” no edema pulmonar que ocorre no envenenamento escorpiónico prousemos-nos

a estudar a expressão pulmonar da subunidade alfa do canal epitelial de sódio (α -ENaC), da α -Na⁺-K⁺-ATPase, Aquaporin 5 (AQP5) e do cotransportador da Na⁺-K⁺-2Cl⁻, NKCC1, em ratos envenenados como veneno de *T. serrulatus*. Além disso, objetivamos avaliar o efeito de um corticosteroide sobre o envenenamento e a expressão dessas proteínas de membrana. O corticosteroide foi a opção feita em razão de ter ação conhecida sobre o canal ENaC⁽⁷³⁾ e por ser uma potencial terapêutica que module a liberação de mediadores inflamatórios relacionados ao edema pulmonar do escorpionismo⁽⁸⁷⁾. Ademais, é droga amplamente utilizada previamente à administração dos antivenenos⁽⁷⁾. Além disso, observamos que, mesmo em situações onde a soroterapia não é indicada, o corticosteroide faz parte da prescrição de alguns profissionais que atendem esses envenenamentos. Em atendimento a profissionais que recorrem ao Hospital Vital Brazil para orientação de conduta em acidentes escorpiônicos de qualquer gravidade, tem-se observado que, em cerca de 10% dos casos, o corticosteroide é administrado anteriormente ao contato (informação pessoal).

Considerando a intensa resposta inflamatória observada no escorpionismo com manifestações sistêmicas^(21-29, 87, 88), propusemos também avaliar o papel do Toll-like receptor 4 (TLR4) neste envenenamento. Os TLRs são componentes chaves na resposta imune inata devido sua habilidade em reconhecer moléculas associadas a patógenos. Em contraste com a resposta imune adaptativa, os TLRs reagem rapidamente a uma ampla gama de moléculas associadas a patógenos sem uma exposição prévia. Eles estão presentes em muitas células imunes como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas e algumas células epiteliais. Uma vez ativados, a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β ou IL-6 é induzida através de uma cascata de sinalização intracelular, que inclui a ativação do fator de transcrição nuclear (NF)- κ B e o fator regulador de interferon 3 (IRF3)⁽⁸⁹⁾.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Obter um modelo de envenenamento escorpiônico grave, que apresente manifestações semelhantes às observadas em humanos.

2.2 Específico

- Avaliar a ação do veneno de *T. serrulatus* sobre a expressão de transportadores de sódio e água e de TLR4 e NF-κB em pulmão de ratos.

- Avaliar a ação do veneno de *T. serrulatus* sobre a liberação de citocinas plasmática em ratos.

- Avaliar a ação do veneno de *T. serrulatus* sobre a infiltração de células mononucleares e polimorfonucleares em pulmão de ratos.

- Avaliar a ação do uso prévio de corticosteroide sobre expressão de transportadores de sódio e água, de TLR4 e NF-κB em pulmão de ratos.

- Avaliar a ação do uso prévio de corticosteroide sobre a liberação de citocinas plasmáticas em animais envenenados com veneno de *T. serrulatus*.

- Avaliar a ação da injeção prévia de corticosteroide sobre o infiltrado celular em pulmão de ratos envenenados com veneno de *T. serrulatus*.

- Avaliar a importância do “stress oxidativo” no escorpionismo.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Envenenamento

Local: O envenenamento animal, estudo dos transportadores e imunoistoquímica foram realizados no Laboratório de Doenças Renais (LIM 12) da Disciplina de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As dosagens de citocinas foram realizadas no Laboratório de Imunobiologia de Transplante do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo.

Veneno: o veneno de *T. serrulatus*, doado pela Seção de Venenos do Instituto Butantan, SP, na forma liofilizada, foi diluído em Soro Fisiológico, aliquotado e estocado em temperatura -70°C.

Animais: ratos Wistar machos adultos, com peso entre 200-250g receberam doses crescentes de veneno de *T. serrulatus* por via intraperitoneal (ip), até a dose em que os animais apresentaram manifestações sistêmicas do envenenamento grave, como sialorréia, sudorese, dispneia. Em um grupo de animais foi administrado dexametasona na dose de 2 mg/kg^(73, 90), por via ip, 60 minutos antes da injeção do veneno de *T. serrulatus*. Animais controle receberam apenas SF por via ip. Após receber a injeção do veneno, os animais foram observados em gaiola por uma hora e, posteriormente, anestesiados com Tiopental sódico (40 mg/kg) por via ip. A aorta foi canulada para coleta de sangue e posterior perfusão com tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15mM, tampão fosfato 0,01M, pH 7,4) por 10 minutos. Após a perfusão dos órgãos, os pulmões foram retirados e guardados a -70°C (pulmão direito) e em formaldeído 4% (pulmão esquerdo). O sangue, colhido com heparina, foi centrifugado e o plasma guardado a -70°C, para estudo bioquímico e dosagem de citocinas. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, do HCFMUSP e da FMUSP (nº 515/09).

3.2 Estudo bioquímico

Sódio, potássio foram medidos através da técnica de eletrodo íon seletivo; ureia, CPK, ALT, AST e amilase foram medidos pelo método de cinética automatizado; creatinina através de método colorimétrico automatizado e a troponina pelo método de eletroquimioluminescência.

3.3 Western blotting para estudo das proteínas transportadoras de sódio e água do epitélio pulmonar e do Toll-like receptor 4

Anticorpos: o anticorpo monoclonal anti-NKCC1 foi gentilmente doado pelo Dr. R James Turner, do National Institute of Dental and Craniofacial Research, EUA. Anticorpos policlonais específicos para AQP5, α -ENaC e α_1 Na,K-ATPase, Toll-like receptor 4 (TLR4) e actina foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Extração de proteínas de membranas: amostras de pulmões foram homogeneizadas em nitrogênio líquido em solução de K-Hepes (200mM Mannitol, 80 mM Hepes, 41 mM KOH, pH 7,5) com inibidor de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St Louis, MO). O material foi centrifugado a 3150 g por 30 minutos a 4°C para remover núcleos e debris celulares. Em sequência, o sobrenadante foi centrifugado a 1000.000g por 1 hora a 4°C (rotor 50 Ti) e o pellet (contendo proteínas de membrana) ressuspendido em uma solução de K-HEPES com inibidores de proteases. A medida da concentração de proteínas foi realizada através do método de Bradford (Bioagency)

Western blotting (WB): para a realização do WB, foi utilizada 50µg de proteína de cada amostra. A eletroforese de amostras de proteínas de membrana foi feita em minigel de poliacrilamida a 8% (para NKCC1), 10% (para ENaC, α_1 -Na⁺-K⁺-ATPase e TLR4) e 12% (para Aquaporin 5). Após

transferência para membrana de nitrocelulose, esta foi bloqueada com leite a 5% em PBS-T (80mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1% Tween20, pH 7,5) por 1 hora. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-NKCC1 (1:1000) , anti- α -ENaC (1:100), anti- α_1 -Na⁺-K⁺-ATPase (1:500), anti-Aquaporin 5 (1:500), e TLR4 (1:100). A marcação foi visualizada com anticorpo secundário conjugado com “peroxidase (HRP)- conjugated secondary antibody” (Sigma Chemical Company, St Louis, MO), através da quimioluminiscência (ECL, Amersham).

A análise quantitativa foi realizada usando Image J. As bandas foram normalizadas pela expressão de actina. Os valores foram expressos em porcentagem em relação à média dos controles.

3.4 Avaliação do “stress oxidativo”

O stress oxidativo foi avaliado determinando os níveis plasmáticos de TBARS (“thiobarbituric acid reactive substances”), um marcador da peroxidação lipídica, através do ensaio do ácido tiobarbitúrico. O ácido tiobarbitúrico reage com lipídios oxidados, gerando malondialdeído.

Uma alíquota de 0,2 ml foi diluída em 0,8 ml de água destilada. Após, 1 ml de ácido tricloroacético (ATC) 17,5% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico, pH 2, foram adicionados. As amostras foram levadas a 80°C por 20 minutos e a seguir, colocadas em gelo. Um mililitro de ATC 70% foi adicionado e, posteriormente, a mistura incubada por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, por 15 minutos. A densidade ótica do sobrenadante foi lida a 534 nm contra um reagente “blank” em espectrofotômetro. Os níveis plasmáticos de TBARS foram expressos como nmol/mL(91).

3.5 Imunoistoquímica

Fragmentos de pulmões dos três grupos estudados foram submersos em paraformaldeído a 4%, fixado por 2 horas e, posteriormente, pós-fixado em solução de Bouin por 4 horas. A solução de Bouin foi removida e o tecido foi submetido a banhos sucessivos de etanol 70% e embebido em parafina. Secções de 4 µm foram desparafinizadas e submetidas a imunoistoquímica.

Os tecidos foram incubados overnight a 4°C com anticorpo anti-NF-κB (1:100), anti-AQP5 (1:50), anti-neutrófilo (1:150) e anti-CD68 (1:1000). A reação foi detectada com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A reação de coloração foi desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina (DAB) e cloridrato de níquel 8% na presença de peróxido de hidrogênio. O material foi submetido à contracoloração com “metil green”, desidratado e, a seguir, montado a lâmina. Para obter o número médio de células CD-68+ (macrófagos/monócitos) e neutrófilos infiltrados no tecido pulmonar, 30 campos medindo 0.087 mm² foram avaliados e a média por campo foi calculada. A contagem foi realizada a 400X. A proporção de NF-κB no tecido alveolar dos cortes pulmonares foi determinada dividindo o número de pontos positivos para NF-κB pelo número total de pontos marcando os alvéolos. As medidas foram realizadas observando 20 campos de cada animal, a 400X. Os resultados foram expressos como percentagem de área positiva pelo total de área de tecido. A contagem de células positivas foi realizada usando o software AxioVision Rel. 4.6 (Carl Zeiss, Eching, Alemanha) e as medidas de área e porcentagem foram avaliadas com o software Image-Pro Plus 4.1 for Windows (Media Cybernetics—Silver Spring, MD, EUA).

Anticorpos específicos para AQP5, neutrófilo e NF-κB foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA), e para células CD68 foi obtido da ABD Serotec (Raleigh, NC, EUA).

3.6 Avaliação de citocinas no plasma

Os níveis plasmáticos de citocinas foram medidos e analisados através do sistema Bio-Plex. O painel utilizado foi o “Rat base kit” (Lur 000) da R&D (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos), analisando as citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α . O ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante. Brevemente, o filtro da placa “multiwell” 96 foi lavado com “Wash Buffer” (R&D Systems) e, em seguida, 30 μ L do plasma dos animais foi adicionado e posteriormente, as esferas conjugadas com anticorpos anti-citocinas. Após período de incubação de 3 h, a placa foi novamente lavada com “Wash Buffer”, sendo então adicionado a cada well o anticorpo de detecção biotinilado para um epítipo diferente da citocina, formando então um sanduíche de anticorpos. Seguiu-se incubação por 1h e, após esse período, novas lavagens com o “Wash Buffer” foram realizadas, sendo então adicionado Streptavidin conjugada com PE (R&D Systems), que se liga ao anticorpo biotinilado. Após 30 minutos de incubação, novas lavagens foram realizadas com “Wash Buffer”, os “beads” foram ressuspensos com “Assay Buffer” (R&D Systems) e analisados no Bioplex 200 Suspension Array System/ Luminex (Bio Rad, Hercules, CA) através do Software Bio-Plex Manager, versão 6.0 (Millipore, MA). Foram analisados o plasma de quatro animais do grupo Cont, cinco do grupo Vn e oito do grupo Dx+Vn.

3.7 Análise estatística

Diferenças entre médias de múltiplos parâmetros foram analisadas através do teste ANOVA seguida por Student-Newman-Keuls. Para variáveis que não apresentavam distribuição normal foram utilizados os testes Mann–Whitney e Kruskal Wallis para comparações.

O teste de Qui quadrado foi aplicado para comparar frequências. Quando pelo menos uma das células da tabela de contingência 2X2 apresentava uma frequência menor que cinco, foi utilizado o teste exato de Fisher.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas GraphPad Prism5, STATA versão 8.0, e SigmaStat, versão 3.5.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Envenenamento

Foram administradas doses crescentes de veneno de *T. serrulatus*, a partir de 0,5 mg/kg, via intraperitoneal. Com a dose de 3,8 mg/kg foi possível observar manifestações sistêmicas já a partir de 30 minutos da injeção do veneno. A primeira manifestação observada foi lacrimejamento e posteriormente dispnéia, sialorréia, sudorese, secreção ocular sanguinolenta e cianose (não necessariamente nesta ordem). Alterações sistêmicas foram observadas no grupo veneno (Vn) bem como no grupo envenenado que recebeu a dexametasona previamente ao veneno (Dx+Vn). No grupo Vn, 4 animais (30,8%) não apresentaram alterações compatíveis com envenenamento grave e no grupo Dx+Vn, 2 animais (18,2%) permaneceram clinicamente bem no período avaliado ($p=0,649$). Por outro lado, alguns ratos foram sacrificados antes de uma hora de observação devido ao fato de apresentarem-se agônicos, em péssimo estado geral (Vn: 1/13 vs. Dx+Vn:4/11; $p=0,142$). Na tabela 1 podem ser observados o tempo de observação e as manifestações clínicas apresentadas, segundo o grupo (Cont: ratos controles; Vn: ratos envenenados e Dx+Vn: ratos envenenados que receberam dexametasona previamente ao veneno).

Tabela 1- Manifestações sistêmicas observadas em ratos que receberam injeção via ip de veneno de *T. serrulatus*, dexametasona e veneno e em ratos controle

GRUPO	Tempo de						Dor à manipulação
	observação (min)	Dispnéia	Secreção ocular	Sialorréia	Cianose	Sudorese	
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Cont	60	N	N	N	N	N	N
Vn	90	S	Sanguinolenta	S	S	S	S
Vn	60	S	S	S	N	S	S

continua

Tabela 1 – Manifestações sistêmicas observadas em ratos que receberam injeção via ip de veneno de *T. serrulatus*, dexametasona e veneno e em ratos controle, continuação

GRUPO	Tempo de observação (min)	Dispnéia	Secreção ocular	Sialorréia	Cianose	Sudorese	Dor à manipulação
Vn	60	S	S	S	N	N	S
Vn	90	N	N	N	N	N	N
Vn	75	S	S	S	N	N	N
Vn	75	N	N	N	N	N	N
Vn	60	S	Sanguinolenta	S	N	N	S
Vn	80	N	N	N	N	N	N
Vn	50	S	Sanguinolenta	N	S	N	Ignorado
Vn	60	S	Sanguinolenta	S	N	S	S
Vn	60	N	N	N	N	N	N
Vn	60	N	Sanguinolenta	S	N	S	Ignorado
Vn	60	N	Sanguinolenta	S	N	S	Ignorado

continua

Tabela 1 - Manifestações sistêmicas observadas em ratos que receberam injeção via ip de veneno de *T. serrulatus*, dexametasona e veneno e em ratos controle, conclusão

Tempo de observação		Dor à					
GRUPO	(min)	Dispnéia	Secreção ocular	Sialorréia	Cianose	Sudorese	manipulação
Dx+Vn	60	N	N	N	N	N	N
Dx+Vn	60	S	Sanguinolenta	S	N	N	N
Dx+Vn	60	N	S	S	N	N	N
Dx+Vn	55	S	Sanguinolenta	S	S	S	S
Dx+Vn	40	S	Sanguinolenta	S	S	S	Ignorado
Dx+Vn	60	N	N	N	N	N	S
Dx+Vn	60	S	Sanguinolenta	S	S	S	S
Dx+Vn	60	N	S	N	N	S	N
Dx+Vn	60	S	N	S	S	N	S
Dx+Vn	45	S	Sanguinolenta	N	S	S	S
Dx+Vn	50	S	Sanguinolenta	N	S	N	S

4.2 Análise bioquímica

4.2.1 Análise bioquímica realizada nos grupo Cont, Vn e Dx+Vn:

Após o tempo determinado para avaliação clínica, os ratos foram anestesiados com Tiopental sódico via ip (40 mg/kg) e o sangue foi coletado através da aorta cateterizada para dosagens bioquímica realizada no plasma. Entretanto, em alguns ratos o sangue foi obtido via arterial após massagem cardíaca ou através de punção cardíaca devido ao péssimo estado em que o animal se encontrava. Na tabela 2 estão descritos os resultados obtidos. Para realização das análises estáticas foram utilizados apenas os exames em que o sangue foi colhido através da aorta cateterizada, pois nos demais animais os resultados expressariam o envenenamento e o sofrimento celular decorrente da insuficiência circulatória pós-parada cardíaca.

Os níveis de potássio estavam menores no grupo Vn que no grupo controle (Figuras 3 e 4), enquanto as dosagens de amilase apresentaram-se estatisticamente mais elevadas no grupo Dx+Vn que no grupo Cont (Figuras 13 e 14). Em relação aos demais testes bioquímicos analisados, não houve diferença entre os grupos estudados.

A seguir, os resultados dos exames laboratoriais são apresentados em gráficos que representam $\text{média} \pm \text{erro padrão}$ e os valores obtidos em cada animal (Figuras 2 a 17).

Tabela 2 - Resultado dos testes laboratoriais realizados em ratos que receberam injeção via ip de veneno de *T. serrulatus*, dexametasona e veneno e em ratos controle

GRUPO	Na	K	U	Cr	CPK	DHL	Troponina	Amilase
Cont	145	4,0	44	0,21	776	452	0,01	2017
Cont	154	5,1	32	0,29	860	-	-	2307
Cont	138	3,5	42	0,25	383	420	0,01	2553
Cont	150	3,9	44	0,25	818	1360	0,01	2558
Cont	150	4,9	50	-	613	-	-	2442
Cont	138	4,0	45	0,42	633	-	-	1742
Cont	136	4,3	35	0,35	533	-	-	2207
Cont	146	4,6	35	0,43	467	-	-	2130
Cont	138	4,2	28	0,32	314	997	0,55	2280
Vn ^a	137	3,5	40	0,24	827	972	0,01	2541
Vn ^a	144	3,1	65	0,38	981	606	0,32	2357
Vn ^a	144	3,2	35	0,28	427	263	0,01	2158
Vn ^a	133	3,2	38	0,28	558	503	0,01	2538
Vn ^a	145	3,0	44	0,23	361	283	0,01	1962
Vn ^{pc}	162	5,1	54	0,20	1439	560	0,79	1855
Vn ^{pc}	144	3,7	54	0,31	1008	1332	2,20	2136
Vn ^{pc}	165	-	63	0,38	6008	-	25,00	2756
Vn ^{pc}	149	5,5	72	0,55	1746	2169	1,49	2426
Vn ^{mc}	150	6,6	64	0,66	708	886	-	4048
Vn ^{mc}	156	6,1	41	0,53	467	457	0,04	2502
Vn ^{mc}	152	7,4	52	0,36	387	307	0,15	2697
Dx+Vn ^a	143	3,3	34	0,24	349	367	0,01	2480
Dx+Vn ^a	140	3,0	39	0,30	940	763	0,01	2830
Dx+Vn ^{pc}	145	6,5	52	0,44	2375	6068	1,70	3228
Dx+Vn ^{pc}	148	4,5	56	0,41	2755	5721	7,60	2419
Dx+Vn ^{pc}	142	-	57	0,42	3410	6727	7,44	3179
Dx+Vn ^{pc}	171	6,7	56	0,42	3443	2854	17,12	2500

continua

Tabela 2 - Resultado dos testes laboratoriais realizados em ratos que receberam injeção via ip de veneno de *T. serrulatus*, dexametasona e veneno e em ratos controle, conclusão

GRUPO	Na	K	U	Cr	CPK	DHL	Troponina	Amilase
Dx+Vn ^{pc}	143	5,7	56	0,34	1519	1128	3,47	2668
Dx+Vna	146	3,8	57	0,25	810	737	0,01	3958
Dx+Vn ^a	140	3,5	92	0,48	945	478	0,08	3582
Dx+Vn ^{pc}	144	7,4	83	0,56	1058	477	0,41	4665
Dx+Vn ^{pc}	139	8,0	60	0,48	1420	560	0,88	2591

a: coleta arterial; pc: coleta por punção cardíaca; mc: coleta arterial pós massagem cardíaca

4.2.1.a Sódio

Os níveis de sódio foram semelhantes nos três grupos: Cont: $143,1 \pm 2,3$ mEq/L; Vn: $140,6 \pm 2,4$ mEq/L; Dx+Vn: $142,3 \pm 1,4$ mEq/L (Figuras 2 e 3).

Figura 2: Valores das dosagens de sódio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

Figura 3: Média $\pm$ erro padrão dos valores de sódio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

4.2.1.b Potássio

Os níveis plasmáticos de potássio em ratos envenenados estavam menores que no grupo controle ($p<0,05$): Cont: $4,3\pm0,2$ mEq/L; Vn: $3,2\pm0,1$ mEq/L; Dx+Vn: $3,4\pm0,2$ mEq/L (Figuras 4 e 5).

Figura 4: Valores das dosagens de potássio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

Figura 5: Média $\pm$ erro padrão dos valores de potássio obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: Cont, Vn e Dx+Vn; * $p<0,05$ Cont vs. Vn.

4.2.1.c Ureia

Os níveis de ureia encontrados foram semelhantes nos três grupos avaliados: Cont: $38,9 \pm 2,6$ mg/dL; Vn: $44,4 \pm 5,4$ mg/dL; Dx+Vn: $55,5 \pm 13,1$ mg/dL (Figuras 6 e 7).

Figura 6: Valores das dosagens de ureia obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

Figura 7: Média $\pm$ erro padrão dos valores de ureia obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

4.2.1.d Creatinina

Não houve diferença estatística dos níveis de creatinina entre os três grupos analisados (Cont: $0,31 \pm 0,0$ mg/dL X Vn: $0,30 \pm 0,0$ mg/dL; Dx+Vn: $0,30 \pm 0,1$ mg/dL) (Figuras 8 e 9).

Figura 8: Valores das dosagens de creatinina obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

Figura 9: Média $\pm$ erro padrão dos valores de creatinina obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: Cont, Vn e Dx+Vn.

4.2.1.e Creatinofosfoquinase (CPK)

Os três grupos estudados apresentaram níveis semelhantes de CPK: Cont: $572,4 \pm 66,1$ U/L X Vn: $630,8 \pm 118,5$ U/L, Dx+Vn: $761,0,0 \pm 140,8$ U/L (Figuras 10 e 11).

Figura 10: Valores das dosagens de CPK obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

Figura 11: Média $\pm$ erro padrão dos valores de CPK obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: Cont, Vn e Dx+Vn.

4.2.1.f Desidrogenase Láctica (DHL)

Ratos dos três grupos estudados não apresentaram diferenças na dosagem de DHL: Cont: $807,3 \pm 226,9$ U/L; Vn: $525,4 \pm 129,2$ U/L; Dx+Vn: $586,3 \pm 97,4$ U/L (Figuras 12 e 13).

Figura 12: Valores das dosagens de DHL obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

Figura 13: Média $\pm$ erro padrão dos valores de DHL obtidos no plasma de ratos dos grupos estudados: controle, veneno e dexametasona+veneno.

4.2.1.g Amilase

As dosagens de amilase no plasma do grupo Dx+Vn foram maiores que no grupo Cont ($p<0,05$): Cont: $2210,0\pm89,5$ U/L X Vn: $2311,0\pm112,2$ U/L; dx+v: $3213,0\pm338,5$ U/L (Figuras 14 e 15).

Figura 14: Valores das dosagens de amilase obtidos do plasma de ratos dos três grupos estudados: Cont, Vn e Dx+Vn.

Figura 15: Média $\pm$ erro padrão dos valores de amilase obtidos no plasma de ratos dos três grupos estudados: Cont, Vn e Dx+Vn; * $p<0,005$ Cont vs. Dx+Vn.

4.2.1.h Troponina

Ratos controle e aqueles dos grupos Vn e Dx+Vn não apresentaram diferenças na dosagem de troponina: Cont: $0,2 \pm 0,2$ ng/mL; Vn: $0,1 \pm 0,1$ ng/mL; Dx+Vn: $0,02 \pm 0,0$ ng/mL (Figuras 16 e 17).

Figura 16: Valores das dosagens de troponina obtidos do plasma de ratos dos três grupos estudados: Cont, Vn e Dx+Vn.

Figura 17: Média $\pm$ erro padrão dos valores de troponina obtidos no plasma de ratos dos três grupos estudados: Cont, Vn e Dx+Vn.

4.2.2 Análise bioquímica em ratos que receberam apenas dexametasona.

Com o intuito de observar o efeito da dexametasona, isoladamente, sobre as dosagens bioquímicas, foi administrada a droga na dose de 2,0 mg/kg via intraperitoneal em ratos, dosando-se no plasma sódio, potássio, ureia, creatinina, CPK, DHL, amilase e troponina.

Os animais que receberam dexametasona apresentaram os níveis de creatinina e potássio menores que animais controle ($p < 0,05$).

Nas Figuras 18 a 25 são apresentados, para cada teste bioquímico analisado, os valores individuais e a média $\pm$ erro padrão dos valores observados nos animais controle (Cont) e animais que receberam apenas a dexametasona (Dexasolo).

4.2.2.a Sódio

Os níveis de sódio foram semelhantes nos animais controle e aqueles que receberam dexametasona (Cont: $143,9 \pm 2,2$ mEq/L; dexasolo: $148,8 \pm 0,8$ mEq/L) (Figura 18).

Figura 18: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de sódio obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona.

4.2.2.b Potássio

Os animais injetados com dexametasona apresentaram níveis de potássio menores que ratos do grupo controle (Cont: $4,28 \pm 0,17$ mEq/L; dexasolo: $3,60 \pm 0,18$ mEq/L; $p < 0,05$) (Figura 19).

Figura 19: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de potássio obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona (* $p < 0,05$).

4.2.2.c Ureia

Os níveis de ureia foram semelhantes em ambos os grupos avaliados (Cont $39,44 \pm 2,4$ mg/dL; dexasolo: $46,60 \pm 2,9$ mg/dL) (Figura 20).

Figura 20: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de ureia obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona.

4.2.2.d Creatinina

Os níveis de creatinina estavam mais baixos nos ratos do grupo dexasolo em relação aos animais do grupo controle (Cont: $0,31 \pm 0,03$ mg/dL; dexasol: $0,20 \pm 0,01$ mg/dL; $p < 0,05$) (Figura 21).

Figura 21: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de creatinina obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona.

4.2.2.e Creatinofosfoquinase (CPK)

As dosagens de CPK foram semelhantes em ambos os grupos estudados (Cont: $599,70 \pm 64,38$ U/L; dexasolo: $538,20 \pm 65,88$ U/L) (Figura 22).

Figura 22: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de CPK obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona.

4.2.2.f Desidrogenase Lática (DHL)

Não houve diferença estatística nas dosagens de DHL obtidas nos dois grupos (Cont: $807,3 \pm 226,9$ U/L; dexasolo: $435,6 \pm 63,53$ U/L; $p < 0,05$) (Figura 23).

Figura 23: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de DHL obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona.

4.2.2.g Amilase

Ambos os grupos estudados apresentaram valores semelhantes na dosagem de amilase plasmática (Cont: $2248 \pm 87,9$ U/L; dexasolo: $2357 \pm 144,4$ U/L) (Figura 24).

Figura 24: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de amilase obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona.

4.2.2.h Troponina

Não foi observada diferença nos níveis de troponina nos dois grupos estudados (Cont: $0,15 \pm 0,14$ ng/mL; dexasolo: $0,02 \pm 0,01$ ng/mL) (Figura 25).

Figura 25: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de troponina obtidos do plasma dos animais estudados: controle e dexametasona.

4.3. Análise da expressão de proteínas transportadoras de sódio e água presentes em membrana celular, através do Western blotting.

A expressão de proteínas transportadoras de sódio (α -ENaC, NKCC1, α_1 -Na⁺-K⁺-ATPase) e água (AQP5) em tecido pulmonar, avaliada através de Western blotting, é apresentada a seguir (Figuras 26 a 29).

4.3.1 α -ENaC

A expressão da proteína de membrana α -ENaC estava diminuída no tecido pulmonar de ratos envenenados em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu dexametasona ($p < 0,05$). Os animais tratados com a dexametasona apresentaram expressão semelhante ao grupo controle (Cont: $91,48 \pm 8,54\%$; Vn: $43,23 \pm 7,30\%$; Dx+Vn: $78,61 \pm 17,9\%$) (Figura 26).

Figura 26: Imunoblot semiquantitativo de proteínas de membranas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica apresentando valores individuais e média ± erro padrão (* $p < 0,05$ Vn vs. Cont e Vn vs. Dx+Vn). B: imunoblot utilizando anticorpo anti- α -ENaC, revelando a banda de 90 kDa.

4.3.2 NKCC1

A expressão de NKCC1 foi maior nos pulmões de animais envenenados em relação ao grupo controle e ao grupo Dx+Vn ($p<0,05$). Os animais que receberam dexametasona previamente ao veneno apresentaram menor expressão desta proteína em relação ao grupo controle ($p<0,05$) (Cont: $98,52\pm7,37\%$; Vn: $146,2\pm4,53\%$; Dx+Vn: $63,60\pm15,58\%$) (Figura 27).

Figura 27: Imunoblot semiquantitativo de proteínas de membranas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica apresentando valores individuais e média±erro padrão (* $p<0,05$ Vn vs. Cont e Vn vs. Dx+Vn; ** $p<0,05$ Dx+Vn vs. Cont). B: imunoblot utilizando anticorpo anti-NKCC1, revelando a banda de 170 kDa.

4.3.3 α_1 -Na⁺-K⁺-ATPase

A expressão da α_1 -Na⁺-K⁺-ATPase foi semelhante nos tecidos estudados dos três grupos (Cont: 95,29±6,04%; Vn: 102,5±7,25%; Dx+Vn: 102,8 ±7,64%) (Figura 28) .

A

B

Figura 28: Imunoblot semiquantitativo de frações de membranas preparadas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica, apresentando valores individuais e média±erro padrão. B: imunoblot utilizando anticorpo anti- α_1 -Na⁺-K⁺-ATPase , revelando a banda de 98kDa.

4.3.4 AQP5

A expressão da proteína de membrana AQP5 estava diminuída no tecido pulmonar de ratos envenenados e daqueles injetados com dexametasona e veneno em relação ao grupo controle (Cont: $100,1 \pm 9,24\%$; Vn: $46,05 \pm 5,77\%$; Dx+Vn: $43,93 \pm 8,64\%$) ($p < 0,05$) (Figura 29). A Figura 30 mostra a localização da AQP5 na membrana das células do epitélio alveolar.

Figura 29: Imunoblot semiquantitativo de frações de membranas preparadas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica, apresentando valores individuais e média $\pm$ erro padrão (* $p < 0,05$ Vn vs. Cont; ** $p < 0,05$ Dx+Vn vs. Cont). B: imunoblot utilizando anticorpo anti-AQP5, revelando a banda de 35kDa.

Figura 30: Corte histológico de parênquima pulmonar de ratos, onde se observa a localização de AQP5, uma hora após a injeção de veneno de *T. serrulatus* (A:Cont; B:Vn; C: Dx+Vn); 400x.

4.4 “Stress” oxidativo

O “stress” oxidativo avaliado através da concentração plasmática de TBARS (“Thiobarbituric acid-reactive species”) não se mostrou alterado no grupo envenenado bem como no grupo Dx+Vn controle (Cont: $2,67 \pm 0,27$ nmol/ml; Vn: $2,67 \pm 0,30$ nmol/mL; Dx+Vn: $2,82 \pm 0,12$ nmol/mL) (Figura 31).

Figura 31: Valores individuais e média±erro padrão dos níveis de TBARS obtidos do plasma dos animais estudados: Cont, Vn e Dx+Vn.

4.5 TLR4

A expressão da proteína TLR4 foi significativamente maior nos ratos do grupo Vn em relação aos grupos Cont e Dx+Vn (Cont: $100,6 \pm 5,2\%$; Vn: $194 \pm 17,5\%$; Dx+Vn: $106,3 \pm 12,3\%$; $p < 0,05$) (Figura 32).

Figura 32: Imunoblot semiquantitativo de frações de membranas preparadas de tecido pulmonar. A: análise densitométrica, apresentando valores individuais e média $\pm$ erro padrão (* $p < 0,05$ Vn vs. Cont e Vn vs. Dx+Vn). B: imunoblot utilizando anticorpo anti-TLR4, revelando a banda de 89 kDa.

4.6 NF-κB

Não houve diferença no conteúdo de células NF-κB positiva em tecido alveolar nos três grupos estudados (Cont: $12,7 \pm 5,0\%$; Vn: $17,5 \pm 4,5\%$; Dx+Vn: $13,3 \pm 3,9\%$; NS) (Figuras 33a e 33b).

Figura 33a: Gráficos apresentam valores individuais e média $\pm$ erro padrão do conteúdo de células NF-κB no tecido alveolar dos animais, por grupo avaliado.

Figura 33b: Cortes histológicos de parênquima pulmonar de ratos onde se observa a localização de NF-κB, uma hora após a injeção de veneno de *T. serrulatus* (A:Cont; B:Vn; C: Dx+Vn); 400x.

4.7 Infiltração de macrófagos no tecido alveolar

O número de células CD68+ em tecido alveolar foi maior nos grupo Vn em relação aos animais controle, mas não quando comparado ao grupo que recebeu dexametasona previamente ao veneno (Cont: $23,2 \pm 1,3$ células/campo; Vn: $51,9 \pm 6,9$ células/campo; Dx+Vn: $39,4 \pm 3,8$ células/campo; $p < 0,05$ Vn vs. Cont) (Figuras 34a e 34b).

Figura 34a: Gráficos mostram o número de células CD68+ em tecido alveolar, com os valores individuais de cada animal e média $\pm$ erro padrão, segundo o grupo estudado (* $p < 0,05$ Vn vs. Cont).

Figura 34b: Cortes histológicos de parênquima pulmonar de ratos, onde se observa infiltração de células CD68+ uma hora após a injeção de veneno de *T. serrulatus*, nos grupos estudados (A:Cont; B:Vn; C: Dx+Vn); 400x.

4.8 Infiltração de neutrófilos no tecido pulmonar

Não houve diferença significativa na densidade de neutrófilos no tecido alveolar nos três grupos avaliados (Cont: $163,5 \pm 162,5$ células/campo; Vn: $176,3 \pm 44,5$ células/campo; Dx+Vn: $163,0 \pm 70,0$ células/campo, NS) (Figuras 35a e 35b).

Figura 35a: Gráficos mostram o número de neutrófilos em tecido alveolar, com os valores individuais de cada animal e a média $\pm$ erro padrão, segundo o grupo estudado

Figura 35b: Cortes histológico de parênquima pulmonar de ratos, apresentando infiltração de neutrófilos uma hora após a injeção de veneno de *T. serrulatus*, nos grupos estudados (A:Cont; B:Vn; C: Dx+Vn); 400x

4.9 Dosagem de citocinas no plasma

Dentre as citocinas avaliadas, foi possível detectar através do método utilizado IL-6, IL-10 e TNF- α .

4.9.1 IL-6

Os níveis plasmáticos de IL-6 estavam elevados nos grupos Vn e Dx+Vn em relação ao controle, uma hora após a injeção de veneno de *T.serrulatus* (Cont: $41,0 \pm 16,6$ pg/mL; Vn: $114,9 \pm 21,4$ pg/mL; Dx+Vn: $108,9 \pm 8,9$ pg/mL) (Figura 36).

Figura 36: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de IL-6 observados em plasma dos animais estudados, segundo o grupo (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

4.9.2 TNF- α

Nos grupos Vn e Dx+Vn os níveis plasmáticos de TNF- α estavam maiores em relação ao grupo controle (Cont: $5,9 \pm 3,3$ pg/ mL; Vn: $11,5 \pm 0,0$ pg/ mL; Dx+Vn: $11,5 \pm 0,0$ pg/ mL) (Figura 37).

Figura 37: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de TNF- α plasmático detectados em ratos, segundo o grupo estudado (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

4.9.3 IL-10

Os níveis de IL-10 estavam estatisticamente elevados nos grupos Vn e Dx+Vn em relação ao controle (Cont: $10,0 \pm 2,4$ pg/ mL; Vn: $42,6 \pm 9,0$ pg/ mL; Dx+Vn: $35,7 \pm 6,8$ pg/ mL) (Figura 38).

Figura 38: Valores individuais e média $\pm$ erro padrão dos níveis de IL-10 observado em plasma dos animais estudo, segundo o grupo (* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle).

Discussão

5 DISCUSSÃO

No Brasil, o *T. serrulatus* é a espécie de escorpião que está associada aos envenenamentos mais graves⁽³⁾. Os sinais e sintomas apresentados em pacientes que evoluem com quadros graves incluem vômitos, sudorese, taquicardia, taquipnéia, arritmia cardíaca, insuficiência respiratória decorrente de insuficiência cardíaca e edema pulmonar, e choque^(7, 8, 17). O objetivo do trabalho foi obter um modelo que apresentasse manifestações clínicas semelhantes àsquelas observadas em quadros graves humanos para avaliar a expressão dos transportadores de água e sódio envolvidos no “clearance” alveolar. Inicialmente foi necessário injetar doses crescentes do veneno de *T. serrulatus*, pois não encontramos claramente na literatura doses injetadas via ip de veneno bruto, em mg/kg, para avaliar as manifestações sistêmicas, especialmente no sentido de acometimento respiratório. A dose em que pudemos observar as alterações pretendidas foi de 3,8 mg/kg. É uma dose bastante elevada, considerando-se que em média consegue-se obter em uma extração de *T. serrulatus*, através de choque elétrico, cerca 0,33 mg por animal de veneno seco⁹². Entretanto, a literatura relata alta resistência desses animais às ações desses venenos⁹³. O que pôde ser observado também foi a variação de resposta individual de cada animal ao veneno. Enquanto alguns animais após 30 a 40 minutos do envenenamento já começavam a apresentar sinais de intoxicação, cerca de 30% deles permaneceram no período avaliado sem manifestar alterações sistêmicas na avaliação clínica.

A proposta inicial era observar os animais por uma a duas horas antes de realizar a anestesia para coleta do material. Entretanto, logo no princípio observamos que os animais apresentavam um quadro clínico bastante intenso de envenenamento cerca de 30 a 40 minutos após a injeção do veneno. Por isso, definimos que os animais deveriam ser sacrificados após uma hora do envenenamento. Maurano⁹³ refere que, na intoxicação experimental, quando a dose do veneno é mortal, o animal morre

em um prazo muito curto, e quando esta não o é, uma vez eliminada a toxina o animal se restabelece completamente. Em humanos, quando há quadros graves, que ocorrem especialmente em crianças, os sinais e sintomas do envenenamento são muito precoces, ocorrendo já dentro da primeira hora após a picada⁸.

Outro objetivo do trabalho foi avaliar o papel de um corticosteróide, a dexametasona, na expressão de transportadores de sódio e água envolvidos no “clearance” alveolar em pulmões de ratos envenenados com veneno de *T. serrulatus*. A opção pela administração de um corticosteróide foi pelo seu conhecido efeito em aumentar o “clearance” alveolar^{70, 73} e seu potencial efeito na regulação de mediadores inflamatórios liberados no envenenamento escorpiónico grave. Além disso, é uma droga amplamente utilizada previamente à administração de antivenenos no Brasil⁷. A administração de dexametasona na dose de 2 mg/kg, uma hora antes da injeção do veneno de *T. serrulatus*, não protegeu os animais de um desfecho fatal. A frequência de óbitos foi estatisticamente semelhante nos dois grupos. Estudo com antagonista de receptor de PAF administrado em camundongos, prévia e posteriormente à injeção subcutânea de veneno preveniu lesão pulmonar, mas não teve efeito significativo sobre a letalidade dos animais⁸⁸. Certamente outros fatores contribuem no mecanismo que leva à morte precoce no envenenamento escorpiónico, incluindo o envolvimento dos sistemas cardíaco e nervoso. Considerando a precocidade da evolução para manifestações graves e morte, observada nos animais neste modelo, não foi possível fazer uma observação por tempo mais prolongado, prejudicando, desta forma, a possibilidade de avaliar a ação da dexametasona, após a injeção do veneno, sobre os transportadores de sódio e água em tecido alveolar. Além disso, como os animais foram sacrificados em 1 hora após a administração do veneno, não é modelo ideal para avaliar mortalidade como desfecho. Não foi feito curva de sobrevivência.

Quanto aos resultados dos exames laboratoriais, como em alguns animais a coleta de sangue só pôde ser realizada através de punção cardíaca, durante a parada cardiorrespiratória, optou-se por excluir essas

amostras da análise. Isso foi feito para evitar algum viés decorrente do método de coleta. Portanto, foram utilizados para análise apenas os resultados provenientes das coletas realizadas por via arterial. Observou-se que as dosagens de potássio estavam menores no grupo Vn. Em acidentes humanos com manifestações sistêmicas, hipocalemia tem sido relatada^{7, 8}. No grupo Dx+Vn, apesar do valor menor que o encontrado nos animais controle, não houve diferença estatística. Entretanto, animais injetados com dexametasona isoladamente, apresentaram níveis menores de potássio, em relação ao controle. Com respeito à amilase, o grupo Dx+Vn apresentou valores mais elevados que animais controle. Em acidentes humanos, os níveis de amilase são variáveis e, às vezes, ocorre elevação mais tardiamente⁸. Em animais, os níveis de amilase podem estar elevados 30 minutos após injeção endovenosa de veneno⁹⁴. É possível que os valores elevados de amilase encontrados no grupo Dx+Vn sejam resultado de uma secreção irregular. Entretanto, pode ser resultado de uma ação sinérgica de elevadas dose de dexametasona associada a ação do veneno. Ratos que receberam apenas dexametasona, na dose de 2,0 mg/kg por via intraperitoneal, apresentaram valores semelhantes ao grupo controle, uma hora após a administração da droga. Portanto, em relação à amilase, isso sugere um potencial efeito nocivo da administração do corticosteroide na ausência de administração do antiveneno específico. Os níveis de CPK, DHL e troponina não estavam elevados nos dois grupos estudados, em relação ao controle, provavelmente porque a coleta do sangue foi realizada uma hora após a inoculação do veneno e não houve tempo suficiente para observar o aumento dessas proteínas. No envenenamento escorpiónico grave, os valores de CPK e DHL podem estar normal ou discretamente elevados na admissão do paciente, apresentando aumento progressivo em dosagens seriadas⁸. Ratos jovens que receberam o veneno de *T. fasciolatus*, por via subcutânea, apresentaram aumento de CK e CK-MB oito horas após o envenenamento⁹⁵. Quando o veneno total de *T. serrulatus* ou a Tityustoxina I foi injetada por via endovenosa em camundongos, níveis máximos de CK e DHL foram observados 60 minutos após a inoculação⁹⁴.

Nos grupos aqui estudados a ureia, a creatinina e o sódio mantiveram-se em níveis semelhantes ao do grupo controle.

De-Matos et al.²² demonstraram o papel de células mononucleares no desenvolvimento de lesão pulmonar e na letalidade de ratos que receberam veneno de *T. serrulatus* por via endovenosa (ev). Os autores observaram que a depleção de mastócitos levou à diminuição do edema pulmonar e de óbitos nos animais envenenados. Os monócitos devem liberar mediadores inflamatórios relacionados ao desenvolvimento do edema pulmonar. Por outro lado, Coelho et al.⁸⁸ observaram acúmulo de neutrófilo em tecido pulmonar, medido através da atividade da mieloperoxidase (MPO), em camundongos que receberam veneno de *T. serrulatus* por via subcutânea, com pico de influxo 4 horas após a injeção do veneno. Entretanto, estudos realizados por Matos et al.²³, mostraram que em ratos submetidos a vagotomia bilateral e envenenados por via ev com veneno de *T. serrulatus*, a atividade da mieloperoxidase em pulmão, foi semelhante nos controles, uma hora após o envenenamento. No estudo aqui apresentado, em relação ao infiltrado de células mononucleares em tecido pulmonar, observou-se que o grupo Vn apresentou um maior número de células CD68+ (macrófagos/monócitos) em tecido pulmonar em relação ao grupo controle. Entretanto, o infiltrado mononuclear não foi menor em animais que receberam injeção de dexametasona previamente ao veneno. O infiltrado de neutrófilos foi estatisticamente semelhante nos três grupos estudados. É possível que, no caso dos neutrófilos, não tenha sido observado diferença nos grupo envenenados devido o tempo precoce em que foi realizada a investigação.

Nos casos mais graves de escorpionismo, o edema pulmonar é um achado frequente e pode ser a causa de morte. Em alguns pacientes o edema pulmonar persiste mesmo após 24 horas da administração do antiveneno específico³¹. Além das forças de Starling, o transporte ativo de íons através do epitélio alveolar é responsável pela reabsorção de água do espaço alveolar. O “clearance” de fluidos através do epitélio alveolar depende do transporte ativo de sódio através do epitélio alveolar via canais

ENaC e $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ⁴⁹. O transporte ativo gerado pela bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na membrana basolateral gera um gradiente osmótico favorável à entrada de sódio através do ENaC, na membrana apical. Há, portanto um contínuo transporte de sódio do lúmen para o espaço intersticial⁹⁶. Em pacientes com lesão pulmonar aguda ou síndrome da angústia respiratória aguda, aqueles que apresentam CFA máximo evoluem com letalidade menor e tempo de ventilação mecânica mais curto³⁸. O veneno de *T. serrulatus* diminui a expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em células do epitélio alveolar, em cultura⁸⁶. Os resultados obtidos no trabalho aqui apresentado mostram que o veneno de *T. serrulatus* diminuiu a expressão do $\alpha\text{-ENaC}$ e AQP5. Entretanto, não foi observado diferença na expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no tecido pulmonar de ratos envenenados com o veneno de *T. serrulatus*. Além disso, NKCC1 presente na membrana basolateral apresentou aumento em sua expressão. NKCC1, que é encontrado virtualmente em todas as células, regula o volume celular mediando o influxo de sódio, potássio e cloro. O mecanismo através do qual a célula contraída ativa o NKCC1 é desconhecido⁹⁷. É possível que o veneno de *T. serrulatus* induza a uma redução no CFA através da diminuição da expressão do $\alpha\text{-ENaC}$, levando a um menor transporte de sódio do espaço alveolar para o interstício, reduzindo o gradiente osmótico. A contração celular induzida por esse mecanismo pode estimular a maior expressão do NKCC1 na membrana basolateral do pneumócito ou, eventualmente, o próprio veneno induza a essa maior expressão. Portanto, a diminuição do influxo de sódio (induzido por níveis menores de $\alpha\text{-ENaC}$) associado ao aumento do influxo de sódio do interstício para dentro da célula (induzido pelos elevados níveis de NKCC1), pode bloquear o influxo de sódio e água do espaço alveolar. Além disso, também foi observado que a expressão da AQP5 estava diminuída em pulmões de animais envenenados e isto pode contribuir para uma piora no CFA. Apesar de camundongos nocautes para AQP5 mostrarem a mesma habilidade em realizar o CFA como animais controle⁶⁰, é possível que em associação com alteração na expressão de outros

transportadores, como os de sódio, a diminuição da AQP5 contribua para prejudicar o CFA no escorpionismo grave.

Além de avaliar os efeitos do veneno de *T. serrulatus* na expressão de transportadores de sódio e água presentes no epitélio alveolar, este estudo objetivou avaliar se a dexametasona teria algum efeito modulador sobre a expressão dessas proteínas no envenenamento experimental. Em células A549 e ATII, a expressão do RNA da α , β e γ -ENaC aumentaram após a exposição à dexametasona^{74, 79, 80}. Foi observado neste estudo que a administração prévia da dexametasona em animais envenenados com veneno de *T. serrulatus* preveniu a diminuição da expressão da α -ENaC. Em relação ao NKCC1, foi observado que houve aumento da expressão dessa proteína em animais envenenados. Com a administração da dexametasona, houve queda da expressão do NKCC1 em relação ao grupo envenenado, e também em relação ao grupo controle. Em contraste com o observado em células ATII expostas à dexametasona, que apresentaram aumento do RNAm da subunidade $\beta 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e aumento da expressão de proteínas das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ⁷⁷, não foi encontrada neste estudo nenhuma alteração na expressão da proteína $\alpha_1\text{-Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ com a administração da dexametasona. Da mesma forma, apesar de a expressão da AQP5 estar aumentada em células epiteliais A549 em resposta ao tratamento com dexametasona, no modelo aqui estudado a droga utilizada não preveniu a diminuição da expressão da AQP5 no grupo Dx+Vn⁸¹.

Considerando a resposta inflamatória observada no escorpionismo humano ou experimental e o papel do TLR4 na inflamação, outro objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do veneno de *T. serrulatus* sobre a expressão do TLR4 em tecido pulmonar. Os TLRs foram inicialmente caracterizados por sua interação com ligantes de bactérias e seu envolvimento na ativação celular associado com infecção e sepse. Entretanto, estudos mostram que ambos, TLR2 e TLR4 podem reconhecer ligantes não microbianos⁹⁸⁻¹⁰⁴. Após haver uma interação com o TLR4, ocorre uma sinalização através de vias intracelulares que levam à ativação

de fatores de transcrição como o NF- κ B e o fator regulador de interferon 3 (IRF3), que resulta na transcrição de genes, incluindo citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas imunorreguladoras⁹⁸. Estudos em animais mostram que a ativação do TLR4 através da interação com mediadores não microbianos podem ter um importante papel para a disfunção de órgãos, associado a doenças graves⁸⁹. No estudo aqui realizado foi observado que o veneno de *T. serrulatus* aumentou a expressão do TLR4 em tecido pulmonar e que a dexametasona preveniu esse aumento.

A ativação inflamatória iniciada através do TLR4, como já exposto acima, pode levar à ativação de fatores de transcrição nuclear como o NF- κ B. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo não permitem concluir que esta via esteja ativada no envenenamento escorpiónico. Utilizando técnica de imunistoquímica, não foi observado aumento da expressão NF- κ B em tecido alveolar de ratos envenenados em relação aos animais do grupo controle e tampouco houve mudança na expressão do NF- κ B no tecido pulmonar de animais que receberam a dexametasona previamente ao veneno.

Alguns autores sugerem que, na presença de uma inflamação sistêmica, a expressão de transportadores de sódio em túbulos renais possa ser mediada por citocinas¹⁰⁵. Camundongos que receberam LPS ou citocinas (TNF- α , IL-1 β ou INF- γ) apresentaram expressão diminuída de transportadores de sódio (Na⁺/H⁺, NKCC2 e Na⁺-K⁺-ATPase). Entretanto essa expressão diminuída por LPS não foi observada em camundongos nocaute para citocinas. Por outro lado, o tratamento com doses elevadas de dexametasona atenuou a expressão desses transportadores. Além disso, outros autores relatam que NKCC1 pode determinar a gravidade de pneumonia e sepse em camundongos e a consequente gravidade da lesão pulmonar¹⁰⁶. Esses autores observaram que camundongos deficientes em NKCC1 e que tiveram pneumonia bacteriana induzida foram protegidos de sepse letal. É possível que a geração de citocinas pró-inflamatórias leve ao aumento da expressão de NKCC1 nos epitélio e endotélio pulmonar^{66, 107, 108}. Em conjunto, esses estudos demonstram que há uma interação entre a

geração de citocinas inflamatórias e a expressão de transportadores de sódio nos rins e pulmões. Vários estudos demonstram a presença de ativação inflamatória no escorpionismo, com geração de citocinas pró e anti-inflamatórias^{25-27, 87}. Da mesma forma, o estudo aqui realizado observou aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-10, uma hora após a injeção ip de veneno de *T. serrulatus* em ratos. Entretanto, a injeção prévia de dexametasona não diminuiu a concentração dessas citocinas, avaliadas uma hora após a injeção de veneno. Considerando que a dexametasona modulou a expressão dos transportadores de sódio ENaC e NKCC1 no pulmão, mas não a liberação das citocinas plasmática, não foi possível, neste estudo, associar a expressão dos transportadores de sódio à ativação de mediadores inflamatórios como as citocinas.

Concluindo, foi demonstrado neste estudo que o veneno *T. serrulatus* diminui a expressão de transportadores de sódio e água em tecido alveolar. Portanto, é possível que, além da falência cardíaca e do aumento da permeabilidade vascular que levam ao edema pulmonar, a expressão alterada de alguns transportadores de sódio, como α -ENaC e NKCC1, e do transportador de água, a AQP5, com consequente diminuição do “clearance” do fluido alveolar, atuem conjuntamente na manutenção do edema pulmonar no envenenamento grave.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

6.1 O veneno de *T. serrulatus* diminuiu a expressão de α -ENaC e AQP5 e aumentou a expressão NKCC1 em tecido alveolar de ratos. A administração de dexametasona modificou a expressão dos transportadores de sódio, aumentando a expressão de α -ENaC, e diminuindo NKCC1, mas não alterou a expressão do transportador de água, a AQP5.

6.2 O veneno de *T. serrulatus* aumentou a expressão do TLR4 no tecido alveolar de ratos e a administração prévia de dexametasona preveniu o efeito do veneno

6.3 O veneno de *T. serrulatus* levou a um aumento da liberação de IL-6, IL-10 e TNF- α , bem como aumentou a infiltração de células CD68⁺ em tecido pulmonar. Entretanto, a dexametasona não preveniu essa liberação elevada das citocinas assim como não diminui a infiltração de células CD68⁺ em tecido pulmonar.

6.4 O veneno de *T. serrulatus* assim como a dexametasona não alterou a expressão do NF- κ B e a infiltração de neutrófilos no parênquima pulmonar de ratos, avaliadas após uma hora da injeção do veneno.

Referências

7 Referências

1. Sinan. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). [Apr 10 2011; cited]; Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.
2. Lourenço WR vEV. Escorpiões de importância médica. In: Cardoso JLC FF, Fan HW, Malaque CMS, Haddad Jr V, editor. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2 ed. São Paulo: Savier- Fapest; 2009. p. 182-97.
3. Bucarechi F, Baracat EC, Nogueira RJ, Chaves A, Zambrone FA, Fonseca MR, et al. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995 Jul-Aug;37(4):331-6.
4. Warnick JE, Albuquerque EX, Diniz CR. Electrophysiological observations on the action of the purified scorpion venom, tityustoxin, on nerve and skeletal muscle of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1976 Jul;198(1):155-67.
5. Becerril B, Marangoni S, Possani LD. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*. 1997 Jun;35(6):821-35.
6. Pardal PP, Castro LC, Jennings E, Pardal JS, Monteiro MR. [Epidemiological and clinical aspects of scorpion envenomation in the region of Santarem, Para, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 May-Jun;36(3):349-53.
7. Brasil. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde; 2001.
8. Cupo P AMM, Hering SE. Escorpionismo. In: Cardoso JLC FF, Fan HW, Malaque CMS, Haddad Jr, editor. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2 ed. São Paulo: Savier/FAPESP; 2009. p. 150-9.

9. Cupo P, Hering SE. Cardiac troponin I release after severe scorpion envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon*. 2002 Jun;40(6):823-30.
10. Abroug F, Boujdaria R, Belghith M, Nouria S, Bouchoucha S. Cardiac dysfunction and pulmonary edema following scorpion envenomation. *Chest*. 1991 Oct;100(4):1057-9.
11. Karnad DR. Haemodynamic patterns in patients with scorpion envenomation. *Heart*. 1998 May;79(5):485-9.
12. Cupo P FA, Filho AP, Pintya AO, Tavares Júnior GA, Caligaris F, Marin-Neto JA, Hering SE, Simões MV. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. *Int J Cardiol*. 2007;116:98-106.
13. Benvenuti LA, Douetts KV, Cardoso JL. Myocardial necrosis after envenomation by the scorpion *Tityus serrulatus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 May-Jun;96(3):275-6.
14. Amaral CF, Barbosa AJ, Leite VH, Tafuri WL, de Rezende NA. Scorpion sting-induced pulmonary oedema: evidence of increased alveolocapillary membrane permeability. *Toxicon*. 1994 Aug;32(8):999-1003.
15. Amaral CF, de Rezende NA, Freire-Maia L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am J Cardiol*. 1993 Jan 15;71(2):242-5.
16. Amaral CF, Lopes JA, Magalhaes RA, de Rezende NA. Electrocardiographic, enzymatic and echocardiographic evidence of myocardial damage after *Tityus serrulatus* scorpion poisoning. *Am J Cardiol*. 1991 Mar 15;67(7):655-7.
17. Cupo P, Jurca M, Azeedo-Marques MM, Oliveira JS, Hering SE. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994 Jan-Feb;36(1):67-76.

18. Ismail M. The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon*. 1995 Jul;33(7):825-58.
19. Teixeira AL, Fontoura BF, Freire-Maia L, Machado CR, Camargos ER, Teixeira MM. Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*. 2001 May;39(5):703-9.
20. Freire-Maia L, de Matos IM. Heparin or a PAF antagonist (BN-52021) prevents the acute pulmonary edema induced by Tityus serrulatus scorpion venom in the rat. *Toxicon*. 1993 Sep;31(9):1207-10.
21. De Matos IM, Rocha OA, Leite R, Freire-Maia L. Lung oedema induced by Tityus serrulatus scorpion venom in the rat. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1997 Oct;118(2):143-8.
22. De-Matos IM, Talvani A, Rocha OO, Freire-Maia L, Teixeira MM. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by Tityus serrulatus venom in rats. *Toxicon*. 2001 Jun;39(6):863-7.
23. Matos IM, Souza DG, Seabra DG, Freire-Maia L, Teixeira MM. Effects of tachykinin NK1 or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jul 9;376(3):293-300.
24. Borges CM, Silveira MR, Aparecida M, Beker CL, Freire-Maia L, Teixeira MM. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. *J Leukoc Biol*. 2000 Apr;67(4):515-9.
25. Pessini AC, de Souza AM, Faccioli LH, Gregorio ZM, Arantes EC. Time course of acute-phase response induced by Tityus serrulatus venom and TsTX-I in mice. *Int Immunopharmacol*. 2003 May;3(5):765-74.
26. Magalhaes MM, Pereira ME, Amaral CF, Rezende NA, Campolina D, Bucarechi F, et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. *Toxicon*. 1999 Aug;37(8):1155-64.

27. Petricevich VL, Pena CF. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators Inflamm.* 2002 Jun;11(3):173-80.
28. Fialho EM, Maciel MC, Silva AC, Reis AS, Assuncao AK, Fortes TS, et al. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon.* 2011 Aug 27.
29. Bertazzi DT, de Assis-Pandochi AI, Azzolini AE, Talhaferro VL, Lazzarini M, Arantes EC. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system in vivo. *Toxicon.* 2003 Mar;41(4):501-8.
30. Freire-Maia L, Campos JA, Amaral CF. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon.* 1994 Sep;32(9):1009-14.
31. De Rezende NA, Dias MB, Campolina D, Chavez-Olortegui C, Diniz CR, Amaral CF. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpions. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 Mar;52(3):277-80.
32. Amaral CF, Rezende NA. Treatment of scorpion envenoming should include both a potent specific antivenom and support of vital functions. *Toxicon.* 2000 Aug;38(8):1005-7.
33. Saumon G. Introduction to alveolar liquid clearance during lung injury: a crucial function--long ignored. *Intensive Care Med.* 2007 Jul;33(7):1241-2.
34. Saumon G, Basset G. Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium. *J Appl Physiol.* 1993 Jan;74(1):1-15.
35. Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev.* 2002 Jul;82(3):569-600.
36. Folkesson HG, Matthay MA. Alveolar epithelial ion and fluid transport: recent progress. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Jul;35(1):10-9.

37. Matthay MA, Clerici C, Saumon G. Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung. *J Appl Physiol*. 2002 Oct;93(4):1533-41.
38. Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 May;163(6):1376-83.
39. Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry LC, Jr. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Oct;79(19):6033-7.
40. Voilley N, Lingueglia E, Champigny G, Mattei MG, Waldmann R, Lazdunski M, et al. The lung amiloride-sensitive Na⁺ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan 4;91(1):247-51.
41. Borok Z, Liebler JM, Lubman RL, Foster MJ, Zhou B, Li X, et al. Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Apr;282(4):L599-608.
42. Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):1966-71.
43. Vadasz I, Raviv S, Sznajder JI. Alveolar epithelium and Na,K-ATPase in acute lung injury. *Intensive Care Med*. 2007 Jul;33(7):1243-51.
44. Matalon S, Bridges RJ, Benos DJ. Amiloride-inhibitable Na⁺ conductive pathways in alveolar type II pneumocytes. *Am J Physiol*. 1991 Feb;260(2 Pt 1):L90-6.
45. Matalon S, O'Brodvich H. Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:627-61.

46. Ridge K, Olivera W, Rutschman DH, Mercer RW, Uhal B, Horowitz S, et al. Alpha-2 Na,K-ATPase contributes to lung liquid clearance. *Ann N Y Acad Sci.* 1997 Nov 3;834:651-2.
47. Factor P, Saldias F, Ridge K, Dumasius V, Zabner J, Jaffe HA, et al. Augmentation of lung liquid clearance via adenovirus-mediated transfer of a Na,K-ATPase beta1 subunit gene. *J Clin Invest.* 1998 Oct 1;102(7):1421-30.
48. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med.* 2004 May;10(5):487-93.
49. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* 1996 Mar;12(3):325-8.
50. Barker PM, Nguyen MS, Gatzky JT, Grubb B, Norman H, Hummler E, et al. Role of gammaENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism. *J Clin Invest.* 1998 Oct 15;102(8):1634-40.
51. McDonald FJ, Yang B, Hrstka RF, Drummond HA, Tarr DE, McCray PB, Jr., et al. Disruption of the beta subunit of the epithelial Na⁺ channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1727-31.
52. Egli M, Duplain H, Lepori M, Cook S, Nicod P, Hummler E, et al. Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. *J Physiol.* 2004 Nov 1;560(Pt 3):857-65.
53. Mutlu GM, Sznajder JI. Mechanisms of pulmonary edema clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Nov;289(5):L685-95.

54. Skou JC. Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep.* 1998 Aug;18(4):155-69.
55. Thome U, Chen L, Factor P, Dumasius V, Freeman B, Sznajder JI, et al. Na,K-ATPase gene transfer mitigates an oxidant-induced decrease of active sodium transport in rat fetal AII cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001 Mar;24(3):245-52.
56. Ridge KM, Olivera WG, Saldias F, Azzam Z, Horowitz S, Rutschman DH, et al. Alveolar type 1 cells express the alpha2 Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance. *Circ Res.* 2003 Mar 7;92(4):453-60.
57. King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol.* 1997 Nov;273(5 Pt 1):C1541-8.
58. Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol.* 1997 Nov;273(5 Pt 1):C1549-61.
59. Funaki H, Yamamoto T, Koyama Y, Kondo D, Yaoita E, Kawasaki K, et al. Localization and expression of AQP5 in cornea, serous salivary glands, and pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998 Oct;275(4 Pt 1):C1151-7.
60. Ma T, Fukuda N, Song Y, Matthay MA, Verkman AS. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J Clin Invest.* 2000 Jan;105(1):93-100.
61. Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 May;278(5):L867-79.
62. King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat. *J Clin Invest.* 1996 May 15;97(10):2183-91.

63. Umenishi F, Carter EP, Yang B, Oliver B, Matthay MA, Verkman AS. Sharp increase in rat lung water channel expression in the perinatal period. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996 Nov;15(5):673-9.
64. Yasui M, Serlachius E, Lofgren M, Belusa R, Nielsen S, Aperia A. Perinatal changes in expression of aquaporin-4 and other water and ion transporters in rat lung. *J Physiol*. 1997 Nov 15;505 (Pt 1):3-11.
65. Song Y, Yang B, Matthay MA, Ma T, Verkman AS. Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Dec;279(6):C1744-50.
66. Andrade L, Rodrigues AC, Jr., Sanches TR, Souza RB, Seguro AC. Leptospirosis leads to dysregulation of sodium transporters in the kidney and lung. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Feb;292(2):F586-92.
67. Haas M, Forbush B, 3rd. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:515-34.
68. Haas M. Properties and diversity of (Na-K-Cl) cotransporters. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:443-57.
69. Haas M. The Na-K-Cl cotransporters. *Am J Physiol*. 1994 Oct;267(4 Pt 1):C869-85.
70. Noda M, Suzuki S, Tsubochi H, Sugita M, Maeda S, Kobayashi S, et al. Single dexamethasone injection increases alveolar fluid clearance in adult rats. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4):1183-9.
71. Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA. Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Clin Invest*. 1987 Feb;79(2):335-43.
72. Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, Dagenais A, Berthiaume Y. Impact of beta-adrenergic agonist on Na⁺ channel and Na⁺-K⁺-ATPase expression in alveolar type II cells. *Am J Physiol*. 1998 Aug;275(2 Pt 1):L414-22.

73. Folkesson HG, Norlin A, Wang Y, Abedinpour P, Matthay MA. Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats. *J Appl Physiol*. 2000 Feb;88(2):416-24.
74. Guney S, Schuler A, Ott A, Hoschele S, Zugel S, Baloglu E, et al. Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na⁺-K⁺-ATPase and epithelial Na⁺ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Nov;293(5):L1332-8.
75. Borjesson A, Norlin A, Wang X, Andersson R, Folkesson HG. TNF- α stimulates alveolar liquid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Jan;278(1):L3-12.
76. Olivera WG, Ciccolella DE, Barquin N, Ridge KM, Rutschman DH, Yeates DB, et al. Aldosterone regulates Na,K-ATPase and increases lung edema clearance in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):567-73.
77. Barquin N, Ciccolella DE, Ridge KM, Sznajder JI. Dexamethasone upregulates the Na-K-ATPase in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):L825-30.
78. Lazrak A, Samanta A, Venetsanou K, Barbry P, Matalon S. Modification of biophysical properties of lung epithelial Na(+) channels by dexamethasone. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Sep;279(3):C762-70.
79. Dagenais A, Denis C, Vives MF, Girouard S, Masse C, Nguyen T, et al. Modulation of α -ENaC and α 1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Jul;281(1):L217-30.
80. Itani OA, Auerbach SD, Husted RF, Volk KA, Ageloff S, Knepper MA, et al. Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na(+) transport is

associated with regulated ENaC and sgk1 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Apr;282(4):L631-41.

81. Ben Y, Chen J, Zhu R, Gao L, Bai C. Upregulation of AQP3 and AQP5 induced by dexamethasone and ambroxol in A549 cells. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Apr 30;161(2):111-8.
82. Haas M, Forbush B, 3rd. The Na-K-Cl cotransporters. *J Bioenerg Biomembr*. 1998 Apr;30(2):161-72.
83. Gimenez I. Molecular mechanisms and regulation of furosemide-sensitive Na-K-Cl cotransporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Sep;15(5):517-23.
84. Ali J, Chernicki W, Wood LD. Effect of furosemide in canine low-pressure pulmonary edema. *J Clin Invest*. 1979 Nov;64(5):1494-504.
85. Prabhu VG, Keszler M, Dhanireddy R. Pulmonary function changes after nebulised and intravenous frusemide in ventilated premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1997 Jul;77(1):F32-5.
86. Comellas AP, Pesce LM, Azzam Z, Saldias FJ, Sznajder JI. Scorpion venom decreases lung liquid clearance in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Apr 15;167(8):1064-7.
87. Fukuhara YD, Reis ML, Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQ, Donadi EA. Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting. *Toxicon*. 2003 Jan;41(1):49-55.
88. Coelho FM, Pessini AC, Coelho AM, Pinho VS, Souza DG, Arantes EC, et al. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with Tityus serrulatus venom. *Toxicon*. 2007 Sep 1;50(3):420-7.
89. Lorne E, Dupont H, Abraham E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of non-septic inflammation in critical care medicine? *Intensive Care Med*. 2010 Nov;36(11):1826-35.

90. Cavriani G, Oliveira-Filho RM, Trezena AG, da Silva ZL, Domingos HV, de Arruda MJ, et al. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jun 28;494(2-3):241-9.
91. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979 Jun;95(2):351-8.
92. Bucherl W. [Scorpions and scorpionism in Brazil. I. Maintenance of scorpions in captivity and extraction of venom]. *Mem Inst Butantan.* 1953;25(1):53-82.
93. Maurano H. *Dissertação do Escorpionismo*. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro; 1915.
94. Correa MM, Sampaio SV, Lopes RA, Mancuso LC, Cunha OA, Franco JJ, et al. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon.* 1997 Jul;35(7):1053-67.
95. Pinto MC, Borboleta LR, Melo MB, Labarrere CR, Melo MM. *Tityus fasciolatus* envenomation induced cardio-respiratory alterations in rats. *Toxicon.* 2010 Jun 1;55(6):1132-7.
96. Berthiaume Y, Folkesson HG, Matthay MA. Lung edema clearance: 20 years of progress: invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung. *J Appl Physiol.* 2002 Dec;93(6):2207-13.
97. O'Neill WC. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol.* 1999 May;276(5 Pt 1):C995-C1011.
98. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:141-65.
99. Barsness KA, Arcaroli J, Harken AH, Abraham E, Banerjee A, Reznikov L, et al. Hemorrhage-induced acute lung injury is TLR-4

dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Sep;287(3):R592-9.

100. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2007 Oct;117(10):2847-59.
101. Benhamou Y, Favre J, Musette P, Renet S, Thuillez C, Richard V, et al. Toll-like receptors 4 contribute to endothelial injury and inflammation in hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med*. 2009 May;37(5):1724-8.
102. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20221-9.
103. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):558-61.
104. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):10229-33.
105. Schmidt C, Hocherl K, Schweda F, Kurtz A, Bucher M. Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Apr;18(4):1072-83.
106. Nguyen M, Pace AJ, Koller BH. Mice lacking NKCC1 are protected from development of bacteremia and hypothermic sepsis secondary to bacterial pneumonia. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1383-93.
107. Topper JN, Wasserman SM, Anderson KR, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter BSC2 is differentially regulated by fluid mechanical and inflammatory cytokine stimuli in vascular endothelium. *J Clin Invest*. 1997 Jun 15;99(12):2941-9.

108. Matthay MA, Su X. Pulmonary barriers to pneumonia and sepsis. *Nat Med*. 2007 Jul;13(7):780-1.