UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* é reconhecida
por receptores de reconhecimento padrão e
induz ativação celular e inflamação**

Karina Furlani Zoccal

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* é reconhecida
por receptores de reconhecimento padrão e
induz ativação celular e inflamação**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências

Aplicadas à Farmácia

Orientada: Karina Furlani Zoccal

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena
Faccioli

RIBEIRÃO PRETO

2014

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Zoccal, Karina Furlani

A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* é reconhecida por receptores de reconhecimento padrão e induz ativação celular e inflamação. 115 p.: il. 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. *Tityus serrulatus*; 2. Ativação celular; 3. Resposta inflamatória; 4. Macrófagos; 5. Mediadores inflamatórios; 6. Corpúsculo lipídico.

Foto da capa: Foto retirada do site <http://www.serverquimica.com.br/pragas/escorpioes>, visualizada em 19/05/2015.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karina Furlani Zoccal

A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* é reconhecida por receptores de reconhecimento padrão e induz ativação celular e inflamação.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia
Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena
Faccioli

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO FINANCEIRO: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), PROCESSOS 2009/09829-2 e 2010/18179-9 (bolsa) E 2009/07169-5 (auxílio pesquisa).

Dedico esta Tese aos meus pais: Wanderley e em especial a minha mãe, Roseli,

por minha educação, formação e pelos mais belos exemplos

de honestidade, dignidade, simplicidade e bondade ...

Pela compreensão, apoio e ajuda em todas

as mais difíceis e atribuladas fases de minha vida ...

E, sobretudo, pelo imprescindível e incondicional amor de sempre ...

Ao meu irmão Lucas Furlani Zoccal,

por cada momento vivido, pelas palavras faladas, pelo carinho compartilhado,

pelo amor sincero.....

Ao meu eterno namorado Aller P. Botura,

POR SUA COMPREENSÃO, PACIÊNCIA, CARINHO E CONFORTO

nos momentos de impaciência, aborrecimento, angústia e tristeza ...

Por seu sincero amor de homem e companheiro...

À minha Família!!!

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus e a todos que conscientemente ou não contribuíram para a realização deste trabalho. De maneira especial agradeço:

À minha família que sempre me apoiou e me deu força para seguir em frente. Obrigada Lucas, Aller, pai, tias (os), primas (os), sogra (o), cunhada (o), e em especial, minha vó, que sempre me inspira pela sua força de vontade, mesmo em momentos quase que impossíveis. Um agradecimento especial para minha mãe, por ser meu alicerce e por estar sempre próxima. Amo vocês !!!

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela orientação, pelos ensinamentos edificantes, pela paciência nesses quase cinco anos de convívio acadêmico, e, sobretudo, pela oportunidade da conquista de mais este Título.

À Profa. Dra. Claudia Bitencourt, que me ensinou o “BEABA” da pesquisa com toda dedicação e pela incansável disposição em tirar sempre minhas dúvidas. Obrigada pelo carinho compartilhado nesses anos.

À Profa. Dra. Eliane C. Arantes, pelos diálogos, bem como seu grupo, em especial à Karla Bordon, por fornecer a peçonha e as toxinas do escorpião Tityus serrulatus, utilizadas neste trabalho e por sempre me receberem com carinho e atenção.

Aos Prof. Dr. Auro Nomizo e a Profa. Dra. Fabiani Frantz, pela agradável convivência e amizade construída ao longo dos meus anos no laboratório, bem como pelos diálogos envolvendo conceitos científicos e pessoais.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa dos anos de 2009 a 2014 do Laboratório de Imunologia e Inflamação das Parasitoses (LIIP) e do Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME), com os quais convivo no dia-a-dia e configuram a simbologia de um grupo de pesquisa. Agradeço pela convivência, aprendizado, força e ajuda nos experimentos. Em especial, agradeço as amigas que ganhei durante esses anos, que contribuíram através de

gestos e palavras de carinho, que me ouviram inúmeras vezes, que compartilharam sonhos e esperanças e me ajudaram de maneira incondicional tornando meus dias melhores e felizes.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação, em especial, o Henrique Theodoro, bem como ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP, pela dedicação e profissionalismo.

Ao Dr. Francisco W. Garcia de Paula pelas preciosas discussões, a Msc. Milena S. Espíndola pela colaboração nas correções e todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários, Alyne Galvão, Msc. Caroline Fontanari pelo apoio técnico, a Fabiana Rosseto de Moraes com as análises de citometria de fluxo, e ao Dr. Carlos Sorgi pela discussão de alguns resultados.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP e da FMRP, pela competência na manutenção e qualidade dos animais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

*“A verdadeira viagem do
descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter
novos olhos”* (Marcel Proust).

RESUMO

ZOCCAL, K.F. **A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* é reconhecida por receptores de reconhecimento padrão e induz ativação celular e inflamação.** 2014. 115f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O escorpião *Tityus serrulatus* é considerado uma das espécies mais perigosas para os seres humanos no Brasil, e sua peçonha induz resposta inflamatória local e sistêmica. Neste projeto, tivemos como objetivo estudar a produção de mediadores inflamatórios, as vias de ativação celular e os receptores da imunidade inata responsáveis pelo reconhecimento da peçonha do escorpião *T. serrulatus* (TsV), bem como de suas toxinas. Nós demonstramos que TsV, e suas toxinas Ts1 e Ts6 induzem a produção de NO, IL-6 e TNF- α por células J774.1, as quais podem ser potencializadas pela presença de LPS. No entanto, Ts2 apresenta atividade anti-inflamatória por induzir produção de IL-10 e inibe a liberação de NO, IL-6 e TNF- α , induzida pelo LPS. Mostramos ainda que Ts2 ou Ts6 isoladas do TsV, além das citocinas, induzem a produção dos mediadores lipídicos (LTB₄ e PGE₂), e estes contribuem para o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal. Em conjunto, os nossos dados demonstraram que Ts2 e Ts6 induzem inflamação por mecanismos dependentes da produção de citocinas e mediadores lipídicos, e que Ts2 pode desempenhar papel regulador da resposta. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo reconhecimento da peçonha e indução da liberação de mediadores inflamatórios por células de mamíferos, são desconhecidos. Assim, dando continuidade aos nossos estudos, demonstramos que os receptores TLR2, TLR4 e CD14 reconhecem TsV, e medeiam a produção de citocinas e mediadores lipídicos. Além disso, nós demonstramos que TsV ativa NF- κ B dependente de MyD88, e o fator c-Jun, independente de MyD88. Semelhante ao TsV, a sua toxina majoritária, Ts1, induz a fosforilação de NF- κ B dependente de MyD88, via reconhecimento por TLR2 e TLR4, enquanto a ativação c-Jun é via TLR4, mas independente de MyD88. Dentro deste contexto, nós propusemos o termo Padrões Moleculares Associados à Venenos (VAMP) para se referir às moléculas que são introduzidas no hospedeiro por picadas e são reconhecidas por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), resultando em inflamação. Demonstramos ainda, a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) e a geração de eicosanóides, após o reconhecimento do TsV por TLR2 e TLR4. Nossos dados mostraram que a formação de eicosanóides se correlaciona com a formação dos CLs, que por sua vez são dependentes de TLR2 e TLR4, e da ativação de PPAR γ , sugerindo que este receptor nuclear pode modular a produção de citocinas pró-inflamatórias. Assim, concluímos que PPAR γ pode ser um candidato-alvo atrativo para novas estratégias terapêuticas para prevenção dos efeitos deletérios resultantes da intensa liberação sistêmica de mediadores inflamatórios após envenenamento.

Palavras-chave: *Tityus serrulatus*; Ativação celular; Resposta inflamatória; Macrófagos; Mediadores inflamatórios; Corpúsculo lipídico.

ABSTRACT

ZOCCAL, K.F. 2014. ***Tityus serrulatus* scorpion venom is recognized by pattern recognition receptors and induces cell activation and inflammation.** 115f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Tityus serrulatus is the scorpion considered one of the most dangerous species to humans in Brazil, which venom induces local and systemic inflammatory response. In this project, we aimed to study In this project, we aimed to study the inflammatory mediators production, cell activation and receptors of innate immunity responsible for recognition of the venom of the scorpion *T. serrulatus* (TsV) as well as their toxins. We have demonstrated that TsV and their toxins Ts1 and Ts6 induce NO, IL-6 and TNF- α production in J774.1 cells, which may be potentiated by presence of LPS. However, Ts2 exhibits anti-inflammatory activity due induction of IL-10 production and inhibits the release of NO, IL- 6 and TNF- α induced by LPS. We also show that Ts2 or Ts6 isolated of TsV, besides of the cytokines, induce the production of lipid mediators (LTB₄ and PGE₂), and these mediators contribute to leukocytes recruitment into the peritoneal cavity. Taken together, our data demonstrated that Ts2 and Ts6 induce inflammation by mechanisms dependent on the production of cytokines and lipid mediators, and that Ts2 may play regulatory role on the cell response. Furthermore, continuing our studies, we demonstrated that TLR2, TLR4 and CD14 receptors recognize TsV, mediating cytokines and lipid mediators production. We also showed TsV MyD88-dependent activation of NF- κ B, and a MyD88-independent activation of the factor c-Jun. Similar to TsV, the majority toxin Ts1 induces MyD88-dependent phosphorylation of NF- κ B via TLR2 and TLR4 recognition, while the c-Jun activation is through TLR4 recognition, but independent of MyD88. Within this context, we propose the term Venom-Associated Molecular Pattern (VAMP), to refer molecules that are introduced into the host by stings and recognized by PRRs, resulting in inflammation. Finally, we investigated the formation of lipid bodies (LBs) and generation of eicosanoids, through TsV recognition by TLR2 and TLR4. Our data showed that eicosanoid production correlates with the LBs formation, which are dependent on TLR2, TLR4 and PPAR γ activation, suggesting that this nuclear receptor can modulate cytokines inflammatory. Thus, we suggest that PPAR γ may be an attractive candidate target for novel therapeutic strategies to prevent the deleterious effects of intense systemic release of inflammatory mediators after envenomation.

Keywords: *Tityus serrulatus*; Cell activation; Inflammatory response; macrophages; Inflammatory mediators; Lipid bodies.

RESUMEN

ZOCCAL, K.F. 2014. **El veneno de la *Tityus serrulatus* escorpión es reconocida por receptores de reconocimiento de patrones e induce la activación celular y la inflamación.** 115f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

El escorpión *Tityus serrulatus* es considerado una de las especies más peligrosas para los seres humanos en Brasil, y su veneno induce respuesta inflamatoria local y sistémica. En este proyecto, nuestro objetivo es estudiar la producción de mediadores de la inflamación, el proceso de activación de las células y los receptores de la inmunidad innata responsable del reconocimiento del veneno del *T. serrulatus* escorpión (TsV), así como sus toxinas. Demostramos que TsV, constituido por las toxinas Ts1 y Ts6 inducen la producción de NO, IL-6 y TNF- α por células J774.1 y esta producción puede ser potencializada durante el estímulo con LPS. Sin embargo, Ts2 presenta una actividad anti-inflamatoria, puesto que induce la producción de IL-10, una citosina que inhibe la liberación de NO, IL-6 y TNF- α , inducida por LPS. Adicionalmente, mostramos que Ts2 o Ts6 aisladas de TsV, también inducen la producción de mediadores lipídicos (LTB₄ y PGE₂), y estos mediadores contribuyen en el reclutamiento de leucocitos para la cavidad peritoneal. En conjunto, nuestros resultados demuestran que Ts2 y Ts6 induce inflamación por mecanismos dependientes de la producción de citosinas y mediadores lipídicos, igualmente Ts2 puede desempeñar un papel regulador en la respuesta. A continuación, también demostramos que los receptores TLR2, TLR4 e CD14 reconocen TsV e inducen la producción de citosinas y mediadores lipídicos. Asimismo, demostramos que TsV activa NF- κ B dependiente de MyD88 y el factor -Jun, independiente de MyD88. Similar al TsV, la toxina Ts1 induce la fosforilación de NF- κ B dependiente de MyD88, vía reconocimiento por TLR2 e TLR4, mientras la activación c-Jun y la vía TLR4 es independiente de MyD88. En este contexto, proponemos el término Patrones Moleculares Asociados a Venenos (VAMP) para referirnos a moléculas que son introducidas en el huésped por picaduras y son reconocidas por receptores de la inmunidad innata, o PRRs resultando en inflamación. Adicionalmente, investigamos la formación de corpúsculos lipídicos (CLs) y la generación de eicosanoides, después del reconocimiento del TsV por TLR2 y TLR4. Nuestros resultados muestran que a formación de eicosanoides, se correlaciona con la formación de CLs, que a su vez son dependientes de TLR2, TLR4 y la activación de PPAR γ , lo que sugiere que este receptor puede modular la producción de citosinas pro-inflamatorias. Por tanto, sugerimos que PPAR γ puede ser un candidato para nuevas estrategias terapéuticas para prevención de efectos deletéreos resultantes de la intensa liberación sistémica de mediadores inflamatorios después del envenenamiento.

Palabras claves: *Tityus serrulatus*; Activación celular; Respuesta inflamatoria; Macrófagos; Mediadores inflamatorios; Corpúsculos lipídicos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais espécies brasileiras de escorpiões perigosos.....	01
Figura 2. Animal da espécie <i>T. serrulatus</i> submetido à extração da peçonha.....	04
Figura 3. Avaliação da citotoxicidade de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 pelo MTT em macrófagos peritoneais.....	27
Figura 4. Efeitos de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 sobre a produção de NO na ausência ou presença de LPS.....	29
Figura 5. Efeitos de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 sobre a produção de TNF- α na ausência ou presença de LPS.....	31
Figura 6. Efeitos de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 sobre a produção de IL-6 na ausência ou presença de LPS.....	32
Figura 7. Efeitos de Ts2 sobre a produção de IL-10 na ausência ou presença de LPS.....	33
Figura 8. Recrutamento de leucócitos (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) induzidos pela injeção de Ts2 ou Ts6.....	37
Figura 9. Ts2 ou Ts6 induzem edema na cavidade peritoneal de camundongos.....	38
Figura 10. Efeitos de Ts2 ou Ts6 sobre a produção de citocinas IL-6 (A), TNF- α (B), IL-1 β (C), IFN- γ (D), IL-10 (E) e IL-4 (F).....	40
Figura 11. Efeito de Ts2 ou Ts6 sobre a liberação de PGE ₂ ou LTB ₄ na cavidade peritoneal.....	42
Figura 12. Recrutamento de leucócitos, neutrófilos e células mononucleares induzido por Ts2 ou Ts6 é parcialmente dependente dos mediadores lipídicos....	44
Figura 13. O aumento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos induzido por Ts2 ou Ts6 na cavidade peritoneal é parcialmente regulado por mediadores lipídicos.....	47
Figura 14. TsV e Ts1 não afetam a viabilidade celular.....	52
Figura 15. A inativação de TsV ou Ts1 pelo pré-aquecimento reduziram a produção de IL-6 e TNF- α em macrófagos peritoneais.....	54
Figura 16. A liberação de TNF- α comprova a ausência de LPS no TsV.....	55
Figura 17. TsV e Ts1 induzem liberação de PGE ₂ e LTB ₄ em macrófagos.....	55

Figura 18. TsV e Ts1 aumentam a expressão gênica de <i>Tlr2</i> , <i>Cd14</i> , <i>Myd88</i> e <i>Ptgs2</i> em macrófagos peritoneais.....	56
Figura 19. TLR4, TLR2 e CD14 reconhecem TsV e Ts1 e regulam a produção de IL-6, TNF- α , PGE ₂ e LTB ₄	58
Figura 20. p38 e ERK1/2 estão envolvidas na ativação de macrófagos induzida por TsV.....	60
Figura 21. TsV induz a fosforilação de NF- κ B, I κ B α e c-Jun em macrófagos.....	61
Figura 22. TsV induz ativação de NF- κ B dependente de TLR2- e TLR4- / MyD88, e de AP-1, dependente de TLR4.....	63
Figura 23. Ativação de NF- κ B/AP-1 por TsV e Ts1 em células RAW-Blue™ é dependente de TLR2 e TLR4.....	64
Figura 24. Ts1 induz ativação de NF- κ B dependente de TLR2- e TLR4- / MyD88, e ativação de AP-1, independente de TLR2- e TLR4- / MyD88.....	66
Figura 25. TsV induz formação de CLs e produção de PGE ₂ e LTB ₄	72
Figura 26. TsV aumenta a expressão de <i>Pparg</i> , e a formação de CLs é dependente de TLR4, TLR2 e PPAR γ em macrófagos estimulados.....	75
Figura 27. A produção de LTB ₄ e PGE ₂ é dependente da sinalização por PPAR γ	76
Figura 28. Figura esquemática demonstrando o mecanismo de ação do TsV em macrófagos.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos de acidentes por escorpiões. 2000 a 2011.....	02
Tabela 2. Detecção de Endotoxina utilizando o kit QCL-1000 – LAL (Limulus Amebocyte Lysate).....	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico	JNK: Proteína c-Jun quinase N-terminal
anti-mTLR2-IgG: anticorpo monoclonal IgG purificado anti-TLR2	KO / ^{-/-}: Camundongos deficientes (do inglês, <i>knockout</i>)
AP-1: fator de transcrição (Proteína ativadora-1)	LCP: Lavado da Cavidade Peritoneal
Celecoxibe: composto inibidor da COX-2	LDH: Enzima lactato desidrogenase
CLs: Corpúsculos Lipídicos	5-LO: 5-lipoxigenase
COX-1 e 2: ciclo-oxigenases 1 e 2	LPS: Lipopolissacarídeo
DAMPs: Padrões moleculares associado a danos	LPS-RS: LPS de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , antagonista para TLR4
ERK: Quinase regulada por sinal extracelular	LTs: Leucotrienos
FACs: Citometria de fluxo (do inglês, <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)	LTB₄: Leucotrieno (s) B ₄
Genes endógenos: house keeping constitutivos: Gapdh (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) / Actb (β-actina) / Tbp (β-tubulina)	LXA₂: Lipoxina A ₂
GM-CSF: Fator estimulador de crescimento de macrófagos e granulócitos	5-LOKO: Animais que não possuem o gene funcional da enzima 5-lipoxigenase
GW9662: antagonista do receptor de PPAR-γ	MAPKs: Proteína-quinase ativada por mitógenos
HBSS: meio <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>	MD-2: Proteína de diferenciação mielóide-2
IL: interleucina	MK-886: composto inibidor da proteína ativadora da 5-LO (FLAP)
IFN-γ: Interferon-γ	MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
IκB: inibidor do NF-κB	MyD88: Fator de diferenciação mielóide-88
i.p.: via intra-peritoneal	NF-κB: Proteína de transcrição do fator nuclear-kappa B
IRF3: Fator de transcrição regulador de interferon 3	NO⁻²: Nitrito
	NO: Óxido nítrico
	p38: Proteína 38
	PAF: Fator ativador de plaquetas

PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos

PBS: Salina tamponada com fosfato

PGs: Prostaglandinas

PGE₂: Prostaglandina (s) E₂

PI3K: Via fosfatidilinositol 3-quinase

PKC: Proteína C quinase

PPAR γ : Receptores ativados por proliferador de peroxissomo γ (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor γ*)

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão

qRT-PCR: teste quantitativo de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

SEAP: Gene da fosfatase alcalina embrionária (do inglês, *Secreted embryonic alkaline phosphatase*)

SBF: Soro Bovino Fetal

TIR: Domínio Toll / interleucina-1

TIRAP: Proteína adaptadora contendo o domínio TIR

TLRs: Receptores Toll-like

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

TRAF: Molécula adaptadora TRIF-relacionada

TRIF: Molécula adaptadora contendo o domínio TIR induzindo interferon- β

Ts: *Tityus serrulatus*

TsV: peçonha do escorpião *T. serrulatus* (do inglês, *T. serrulatus* venom)

Ts1, Ts2, Ts6: Toxinas isoladas do TsV

WT: Camundongos selvagens (do inglês, *wild type*)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO: Escorpiões, Casos de envenenamento e Resposta Imune –	
Revisão da Literatura.....	01
1.1. Aspectos Gerais: Os Escorpiões.....	01
1.2. Peçonha e Toxinas Escorpiônicas.....	03
1.3. Resposta Inflamatória e Envenenamento.....	06
1.4. Participação de Receptores de Membrana e a Sinalização Celular Envolvida.....	08
1.5. Papel dos Corpúsculos Lipídicos na Produção de Mediadores Lipídicos por Macrófagos.....	09
2. JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAIS e MÉTODOS.....	14
3.1. Obtenção da peçonha bruta de <i>T. serrulatus</i> e de suas toxinas.....	14
3.2. Animais.....	14
3.3. Cultivo de células de linhagem J774.1.....	15
3.3.1. Ensaio de citotoxicidade em células J774.1.....	15
3.3.2. Design Experimental.....	16
3.4. Avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal.....	16
3.4.1. Injeção de Ts2 ou Ts6 em camundongos e o tratamento com celecoxibe ou MK-886.....	17
3.5. Quantificação de proteínas.....	17
3.6. Obtenção de sangue para determinar o número total e diferencial dos leucócitos.....	17
3.7. Obtenção de macrófagos peritoneais.....	17
3.8. Estudo <i>in vitro</i> para reconhecimento de TsV ou Ts1.....	18
3.8.1. Cultivo de macrófagos peritoneais.....	18
3.8.2. Ensaio para verificar se o reconhecimento de TsV ou Ts1 por macrófagos	

<i>são dependentes de suas estruturas terciárias.....</i>	18
<i>3.8.3. Avaliação da integridade da membrana celular.....</i>	19
<i>3.9. Indução de corpúsculos lipídicos.....</i>	19
<i>3.9.1. Coloração e contagem de CLs.....</i>	20
<i>3.10. Determinação da concentração de Nitrito.....</i>	20
<i>3.11. Determinação da concentração de citocinas.....</i>	20
<i>3.12. Determinação da concentração de mediadores lipídicos.....</i>	21
<i>3.13. Imunofenotipagem de células do lavado peritoneal.....</i>	21
<i>3.14. Análise, por qRT-PCR, da expressão gênica em macrófagos obtidos de camundongos C57Bl/6.....</i>	21
<i>3.15. Ativação do NF-κB.....</i>	23
<i>3.16. Imunoensaio de proteínas fosforiladas.....</i>	23
<i>3.17. Análise de proteínas quinases (MAPKs) por Cytometric Read Array flex sit</i>	24
<i>3.18. Análises Estatísticas.....</i>	25
4. RESULTADOS.....	27
PARTE 1: Estudos sobre a ativação e indução da produção de mediadores inflamatórios por macrófagos estimulados com TsV, Ts1, Ts1 e Ts6.....	27
<i>4.1.1. Ensaio in vitro de citotoxicidade da peçonha bruta do escorpião <i>T. serrulatus</i> e de suas toxinas isoladas.....</i>	27
<i>4.1.2. Determinação da concentração de Nitrito presente nos sobrenadantes de cultura de células J774.1 estimuladas com a peçonha bruta ou as toxinas.....</i>	28
<i>4.1.3. Determinação da concentração de citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura de células J774.1 estimuladas com a peçonha bruta ou as toxinas.....</i>	30
Discussão – Parte 1.....	34
PARTE 2: Estudo da produção de mediadores lipídicos e sua contribuição para o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida pelas toxinas Ts2 ou Ts6 da peçonha do escorpião <i>T. serrulatus</i>.....	36
<i>4.2.1. Avaliação do recrutamento de células e aumento de proteína total na cavidade peritoneal.....</i>	36
<i>4.2.2. Determinação de citocinas presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6.....</i>	38
<i>4.2.3. Determinação de LTB₄ e PGE₂ no fluido peritoneal.....</i>	41

4.2.4. O recrutamento de leucócitos induzido por Ts2 ou Ts6 é parcialmente dependente da produção de prostaglandinas e de leucotrienos.....	43
4.2.5. Caracterização imunofenotípica de células recrutadas para a cavidade peritoneal após o tratamento com MK-886 ou celecoxibe em camundongos que receberam a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6.....	45
Discussão – Parte 2.....	49
PARTE 3: Estudo dos mecanismos responsáveis pelo reconhecimento de TsV e Ts1 por macrófagos, e as vias de sinalização intracelular envolvidas na indução de mediadores inflamatórios.....	52
4.3.1. TsV e Ts1 induzem a produção de citocinas e mediadores lipídicos sem afetar a viabilidade celular.....	52
4.3.2. O reconhecimento de TsV e Ts1 pelos macrófagos ocorre através de TLR2, TLR4 e CD14.....	55
4.3.3. Ativação da via de sinalização celular após o reconhecimento por TsV.....	59
4.3.4. Os receptores envolvidos na sinalização intracelular induzida por Ts1 são semelhantes aos receptores ativados por TsV.....	64
Discussão – Parte 3.....	67
PARTE 4: Estudo da sinalização de CLs em macrófagos estimulados com TsV, bem como a produção de mediadores lipídicos.....	71
4.4.1. TsV induz formação de CLs e produção de LTB ₄ e PGE ₂ em macrófagos estimulados.....	71
4.4.2. TsV induz formação de CLs através de TLR2, TLR4 e PPAR-γ.....	72
4.4.3. A produção de LTB ₄ e PGE ₂ é dependente de PPAR em macrófagos estimulados com TsV.....	76
Discussão – Parte 4.....	77
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
7. ANEXOS.....	94

“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir” (Steve Jobs).

1. INTRODUÇÃO

Escorpiões, Casos de envenenamento e Resposta Imune

Revisão da Literatura

1.1. ASPECTOS GERAIS: OS ESCORPIÕES

Os escorpiões são artrópodes quelicerados (Chelicerata), incluídos entre os aracnídeos. Os escorpiões de maior importância médica pertencem à família Buthidae, sendo que os do gênero *Tityus* são os principais causadores de acidentes graves no Brasil (Figura 1). O envenenamento em seres humanos é um problema sério de saúde pública que atinge áreas urbanas e rurais em todo o mundo (MARCUSSE et al., 2011).

Figura 1. Principais espécies brasileiras de escorpiões perigosos.

A maioria dos acidentes graves, incluindo mortes, ocorre em crianças picadas por *T. serrulatus* (Ts) (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 1998; CUPO et al., 2003). No Brasil, 53% dos acidentes decorrentes de animais peçonhentos são causados por escorpiões. Em 2011, foram notificados em nosso país 57.933 acidentes causados por escorpiões (Tabela 1) e 91 óbitos, representando um aumento superior a cinco mil casos de envenenamento, quando comparado ao ano anterior (52.499). Neste mesmo ano, o estado de São Paulo foi considerado o terceiro com maior número de

casos de acidentes por escorpiões (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2011; MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2012).

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010*	2011*
Região Norte	418	680	947	1.380	1.603	1.917	2.043	2.015	2.318	2.762	2.472	2.842
Rondônia	31	54	63	133	167	191	143	80	68	90	102	93
Acre	8	6	16	21	30	28	48	65	81	92	112	133
Amazonas	9	20	41	85	119	166	186	126	192	267	204	224
Roraima	1	16	21	12	18	13	24	33	36	45	48	46
Pará	309	504	631	885	998	1.159	1.267	1.330	1.514	1.675	1.526	1.782
Amapá	11	12	57	78	102	117	149	150	143	142	96	124
Tocantins	49	68	118	166	169	243	226	231	284	451	384	440
Região Nordeste	7.802	8.515	10.402	10.478	13.132	16.142	19.051	19.746	19.278	23.801	25.483	28.885
Maranhão	19	34	63	86	90	132	159	142	138	236	266	404
Piauí	129	197	180	261	207	309	318	274	391	582	520	677
Ceará	8	270	363	341	620	867	563	675	465	719	1.103	1.238
Rio Grande do Norte	1.318	1.251	1.267	1.131	1.245	1.427	1.552	1.279	1.444	2.232	2.381	2.917
Paraíba	181	80	345	301	395	640	899	1.072	1.159	1.123	1.483	1.964
Pernambuco	545	860	1.230	2.185	3.744	4.361	6.837	7.076	5.523	5.208	5.159	5.167
Alagoas	2.527	2.082	2.378	2.102	2.322	2.249	2.599	3.025	3.534	3.798	4.813	5.293
Sergipe	6	15	28	16	40	48	129	258	294	458	660	771
Bahia	3.069	3.726	4.548	4.055	4.469	6.109	5.995	5.945	6.330	9.445	9.098	10.454
Região Sudeste	3.791	7.887	10.093	11.276	13.546	15.836	14.416	13.921	16.605	21.281	21.270	22.531
Minas Gerais	1.189	4.775	6.331	7.023	8.537	10.121	8.849	8.478	9.830	13.069	12.259	13.390
Espírito Santo	203	206	289	354	747	994	755	769	1.132	1.445	1.530	2.013
Rio de Janeiro	81	110	129	216	198	242	235	246	261	246	257	215
São Paulo	2.318	2.796	3.344	3.683	4.064	4.479	4.577	4.428	5.382	6.521	7.224	6.913
Região Sul	81	373	431	479	540	677	765	980	1.010	1.017	1.143	1.271
Paraná	10	278	269	346	381	516	557	723	746	712	806	885
Santa Catarina	59	83	124	104	107	109	149	189	199	195	210	221
Rio Grande do Sul	12	12	38	29	52	52	59	68	65	110	127	165
Região Centro-Oeste	612	733	891	873	1.245	1.366	1.349	1.136	1.490	1.984	2.131	2.404
Mato Grosso do Sul	6	25	44	35	79	138	159	115	283	330	398	689
Mato Grosso	15	86	126	128	265	277	306	369	428	555	596	611
Goiás	372	429	606	550	740	818	764	527	604	883	850	741
Distrito Federal	219	193	115	160	161	133	120	125	175	216	287	363
Brasil	12.704	18.188	22.764	24.486	30.066	35.938	37.624	37.798	40.701	50.845	52.499	57.933
Banco de dados atualizado em:	9/7/2008	9/7/2008	9/7/2008	9/7/2008	9/7/2008	9/7/2008	9/7/2008	16/3/2011	17/3/2011	24/5/2012	24/5/2012	30/5/2012
Fonte: Sinan/SVS/MS - atualizado em 21/06/2012	*Dados preliminares sujeitos a revisão											

Tabela 1: Casos de acidentes por escorpiões. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2011*(MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2012).

A dor é sintoma sempre presente no escorpionismo e a intensidade com que se manifesta depende não só da sensibilidade individual como também da quantidade de peçonha inoculada nos tecidos. Pode ser muito leve, quase imperceptível nos casos benignos, até muito intensa e quase insuportável nos casos mais severos. Pode ocorrer hipertensão seguida de hipotensão arterial e arritmias cardíacas variadas. Nos casos mais severos e tardios, insuficiência cardíaca, bradicardia e edema agudo de pulmão fazem parte do quadro clínico. Os sintomas respiratórios são agravados pela presença de grande quantidade de secreções como também pela presença de constrição traqueobrônquica. Outros sintomas descritos no envenenamento por escorpiões são alteração da visão, tontura,

cefaléia, delírios e alterações no olfato (FREIRE-MAIA et al., 1994; FREIRE-MAIA, 1995; TEIXEIRA et al., 2001).

A gravidade depende de fatores, como a espécie e tamanho do escorpião, a quantidade de peçonha inoculada, região da picada, a massa corporal do acidentado e a sensibilidade do paciente à peçonha. O prognóstico geralmente é bom, principalmente nos acidentes de grau leve e moderado. No escorpionismo grave, as primeiras 24 horas são críticas, pois as complicações surgem dentro desse período, assim como a maioria dos óbitos (MARCUSSE et al., 2011).

1.2. PEÇONHA E TOXINAS ESCORPIÔNICAS

Animais peçonhentos são aqueles que possuem um aparato próprio para inoculação da substância tóxica (a peçonha) a qual é produzida por um grupo de células ou por um órgão secretório apropriado (glândula) conectado ao dispositivo (ferrão, presa, dente, espinhos, etc), ou seja, possuem um mecanismo qualquer que os permite injetar sua peçonha no organismo de outro animal. São exemplos: escorpiões, algumas serpentes, abelhas. Já os animais venenosos são aqueles que produzem as substâncias tóxicas (veneno), mas não possuem um aparelho inoculador, e por isso, dependem da situação para usá-las. O envenenamento pode ser passivo e de diferentes maneiras. Dentre elas, por contato, como a lagarta taturana que possui pêlos por onde é secretado o veneno com um simples contato; pode ser também por compressão, como o sapo, no qual é necessário comprimir as glândulas localizadas no dorso, perto da cabeça; ou por ingestão, como no caso do peixe baiacu, que possui toxinas em vários tecidos do corpo (MARCUSSE et al., 2011).

A peçonha de escorpião é geralmente obtida por estimulação elétrica do télson do animal (técnica de eletrochoque). Esta técnica geralmente é feita por um técnico responsável que utiliza uma pinça para segurar o animal e uma ponta de metal, que libera uma descarga elétrica equivalente a 12 volts. O simples contato da ponta de metal na membrana entre os dois últimos segmentos do télson do escorpião, estimula a liberação da peçonha pelo aguilhão (Figura 2). A peçonha é opalescente, com aspecto leitoso e constituída por uma mistura complexa de muco, componentes de baixo peso molecular (aminoácidos, sais e compostos orgânicos) e muitas proteínas básicas neurotóxicas (MULLER, 1993; GWEE et al., 2002;

COLOGNA et al., 2009). Sendo uma rica fonte de toxinas, peçonhas de diversos artrópodes são reconhecidas como fontes úteis de substâncias bioativas, tais como peptídeos e poliaminas-amidas, demonstrando efeitos farmacológicos sobre a transmissão sináptica. Algumas dessas moléculas têm sido usadas como ferramentas para estender nosso conhecimento das bases moleculares da ação de liberação de neurotransmissores e outros mediadores bioquímicos e imunológicos.

Figura 2. Animal da espécie *T. serrulatus* sendo submetido à extração da peçonha. Adaptada do livro *Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas* (MARCUSSE et al., 2011).

As toxinas de escorpião são de natureza básica e de baixa massa molecular. Elas são divididas em quatro famílias diferentes de acordo com a sua especificidade de ligação aos canais iônicos, podendo agir em canais: (1) para sódio (Na^+), (2) para potássio (K^+), (3) para cloro (Cl^-) e (4) para cálcio (Ca^{+2}) (CATTERALL, 1980; CARBONE et al., 1982; DEBIN et al., 1993; BECERRIL et al., 1997; VALDIVIA & POSSANI, 1998).

Toxinas escorpiônicas que atuam em canais para Na^+

Toxinas escorpiônicas que atuam em canais para Na^+ são os polipeptídeos tóxicos mais reativos presentes na peçonha de escorpiões e são as principais

responsáveis pelos efeitos neurotóxicos do envenenamento escorpiônico. Estas toxinas possuem uma cadeia de aminoácidos com 58-76 resíduos, estabilizados por 4 pontes dissulfeto e possuem peso molecular entre 6.500 a 8.500, sendo maior do que as que atuam em canais para K^+ (POSSANI et al., 2000; RODRIGUEZ DE LA VEGA & POSSANI, 2005). As toxinas desta família podem ser subdivididas em dois grupos de acordo com estudos eletrofisiológicos, com o modo de ação e propriedades de ligação nos canais (POSSANI et al., 1999), α - e β - neurotoxinas escorpiônicas, como exemplos, Ts2 e Ts1, respectivamente. A Ts1, a principal toxina da peçonha bruta do escorpião *T. serrulatus* (TsV), corresponde a 16% da peçonha solúvel e contribui significativamente para a toxicidade (VASCONCELOS et al., 2005). Ts1 (UniProt ID P15226) contém 61 resíduos de aminoácidos, incluindo 8 resíduos de cisteína e peso molecular de 6.890. É uma β -neurotoxina que se liga ao canal de Na^+ , podendo despolarizar a membrana, reduzindo a amplitude do potencial de ação e aumentando a sua duração (JONAS et al., 1986). Já a Ts2, representa 3% do TsV e também é conhecida como TsTX-III (POSSANI et al., 1991). É uma neurotoxina que atua em canais para Na^+ (CESTELE & CATTERALL, 2000; DENAC et al., 2000), contém 62 aminoácidos (Uniprot ID P68410), incluindo 8 resíduos de cisteína (MANSUELLE et al., 1992) e possui peso molecular de 6.998. Ts2 é uma α -neurotoxina que inibe a inativação rápida dos subtipos dos canais de sódio NaV1.2, NaV1.3, NaV1.5, NaV1.6 e NaV1.7, mas não afeta NaV1.4, NaV1.8 ou DmNav1 (COLOGNA et al., 2012).

Toxinas escorpiônicas que atuam em canais para K^+

Quase todas as toxinas escorpiônicas específicas para canais para de K^+ tem cerca de 30-40 resíduos de aminoácidos que são estabilizados por três ou quatro pontes dissulfeto (OLAMENDI-PORTUGAL et al., 1996; POSSANI et al., 1999; TYTGAT et al., 1999; GARCIA et al., 2001). A ligação do peptídeo ao canal ocorre através de uma reação biomolecular reversível, por meio de interações eletrostáticas entre resíduos carregados negativamente no canal e resíduos carregados positivamente no peptídeo (GIANGIACOMO et al., 1992; GARCIA et al., 2001), bloqueando o poro. A Ts6 (Uniprot ID P59936), representa 2,5% do TsV, e é também chamada de TsTX-IV (ARANTES et al., 1989), contém 40 aminoácidos, incluindo 8 resíduos de cisteína (PIMENTA et al., 2003) e peso molecular de 4.514.

1.3. RESPOSTA INFLAMATÓRIA E ENVENENAMENTO

A inflamação é um processo fisiopatológico e pode ser desencadeada por vários estímulos como agentes infecciosos, químicos, físicos, radiação ultravioleta, interação antígeno-anticorpo e resposta imune (HERSH & BODEY, 1970). Inflamação pode ser definida como uma resposta dos tecidos vascularizados a um estímulo, resultando no extravasamento de fluídos e o acúmulo de leucócitos nos tecidos. Os eventos que ocorrem nos tecidos vascularizados são responsáveis pelos cinco sinais clássicos da inflamação: calor, rubor, edema, dor e perda de função (VANE & BOTTING, 1987). Estes eventos são desencadeados por diferentes mediadores presentes no plasma ou produzidos pelas células residentes, ou ainda, pelas células recrutadas para o local da inflamação. Os principais mediadores responsáveis pelo edema são: histamina, prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), fator ativador de plaquetas (PAF), produtos do sistema das cininas (exemplo bradicinina), fatores do complemento (exemplos C3a, C5a), fatores do sistema de coagulação e/ou sistema fibrinolítico (PAUL, 1997).

Os macrófagos participam de diferentes mecanismos patológicos e homeostáticos, desempenhando papel importante nas funções imunológicas. Com base no seu estado de ativação, os macrófagos podem ser referidos como Tipo I (ou M1 ou ativados pela via clássica) ou Tipo II (ou M2 ou ativados pela via alternativa). A ativação de M1 ocorre em resposta ao LPS e IFN γ e é caracterizada pela produção de IL-12 e IL-23 (AKIRA et al., 2013). Uma vez polarizado como M1, o macrófago é caracterizado pela alta capacidade de apresentar antígenos e de produzir fatores que promovem a proliferação e atividade de células T. Esta ativação também resulta na produção de óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*, NO) e espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, os macrófagos M1 podem servir como potentes células efetoras que combatem microorganismos, apresentam antígenos e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, tais como, TNF- α , IL-6 e IL-1 (MANTOVANI et al., 2004; OWEN & MOHAMADZADEH, 2013). A ativação dos macrófagos tipo II ocorre após a exposição a hormônios glicocorticóides e interleucinas como IL-4, IL-10 e IL-13 (LIU & YANG, 2013). Estas células têm pouca capacidade de apresentar antígenos, produzem fatores que suprimem a proliferação e atividade de células T e geralmente são bem mais adaptadas à eliminação de restos celulares, reparação e remodelação de tecidos danificados (MANTOVANI et

al., 2004; SICA et al., 2008). Assim, a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias é rigorosamente controlada por um mecanismo de “*feedback*” complexo (VAN DISSEL et al., 1998; TANIGUCHI et al., 1999). O desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias contribui para ocorrência do choque, falência múltipla de órgãos e morte (PETRICEVICH, 2004; PETRICEVICH, 2006; PETRICEVICH, 2010).

Dados da literatura demonstraram que quando inoculados na cavidade peritoneal de ratos, TsV e Ts1 induziram resposta inflamatória aguda, mediada pela liberação de citocinas como IL-6, IL-1 α e TNF- α . (PESSINI et al., 2003). Outros estudos mostraram que peçonhas de escorpiões podem estimular o eixo imuno-neuroendócrino, pela liberação de catecolaminas, corticóides e bradicinina (CHAUDRY, 1989; SOFER et al., 1996; MAGALHAES et al., 1999; PESSINI et al., 2003); e também a via dos eicosanóides, ocorrendo a produção de PGE₂, lipoxina (LX)A₂ e LTB₄ (TEIXEIRA et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2005), que auxiliam a liberação de citocinas e quimiocinas. Também em humanos, o envenenamento por escorpião, induziu aumento da produção das citocinas IL-1 α , IL-6, interferon (IFN)- γ , fator estimulador de crescimento de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (MAGALHAES et al., 1999) e NO (PETRICEVICH & PENA, 2002). A liberação de citocinas como IL-10, também foi observada no plasma de pacientes tanto em casos de envenenamento moderado quanto severo, e demonstraram ter um papel regulador (FUKUHARA et al., 2003; PETRICEVICH, 2010).

Os LTs e PGs são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pelas vias das enzimas 5-lipoxigenase (5-LO) e ciclooxigenase-1 e 2 (COX-1 e 2), respectivamente. Fatores secretados pelas células ou distúrbios induzidos por patógenos, atuam na membrana plasmática e provocam aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação de fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para a membrana nuclear. Este processo culmina na liberação do AA dos fosfolipídios de membrana, o qual pode sofrer a ação tanto da 5-LO, para a síntese de LTs, quanto das COXs, para a síntese de PGs (PETERS-GOLDEN & BROCK, 2000; SAMUELSSON, 2000; FUNK, 2001). Os LTs e PGs estão aumentados em diversas desordens inflamatórias do pulmão, incluindo doenças infecciosas, como a histoplasmose (MEDEIROS et al., 2004; SECATTO et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; SECATTO et al., 2014) e tuberculose (PERES et al., 2007). A PGE₂ está envolvida na resposta inflamatória (FRUSCELLA et al., 2001), no recrutamento de

neutrófilos em camundongos inoculados com TsV (PESSINI et al., 2006). Estudos mostraram que a PGE₂ é também produzida após a inoculação intraperitoneal (i.p.) de fosfolipase A₂ de veneno da serpente *Bothrops asper* em camundongos (MOREIRA et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que a crotoxina (neurotoxina isolada da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*) induz um efeito antinociceptivo, em ratos, e que este efeito é modulado pelos mediadores lipídicos derivados da via da 5-LO (NOGUEIRA-NETO et al., 2008). No entanto, o conhecimento nessa área ainda é escasso e são necessários estudos mais aprofundados sobre a participação dos mediadores lipídicos no recrutamento de células induzido pelas toxinas do escorpião *T. serrulatus*.

1.4. PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES DE MEMBRANA E A SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDA

Sabe-se que mediadores inflamatórios são liberados durante a resposta inflamatória após o reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (LENTSCHAT et al., 2005; O'NEILL & BOWIE, 2007; SORGI et al., 2009; LIU et al., 2011; YANG et al., 2013).

Receptores Toll-like (TLRs) são PRRs presentes em células do sistema imune inato que detectam a invasão do patógeno e distinguem com alta sensibilidade e especificidade padrões microbianos que são distintos das moléculas do hospedeiro (MEDZHITOV, 2007). Também reconhecem sinais não-microbianos, como os resultantes de lesão tecidual (CHEN & NUNEZ, 2010). TLRs são expressos nos leucócitos, mas são particularmente abundantes em macrófagos (TAKEDA et al., 2003). O reconhecimento de moléculas por TLRs ativam vias de sinalização que resultam em ativação celular. Vários eventos são induzidos durante este processo, incluindo a fosforilação de fatores de transcrição como, do fator nuclear kappa B (NF-κB) e da proteína ativadora (AP)-1, que se translocam para o núcleo e induzem a expressão de genes de citocinas inflamatórias. Em células não estimuladas, a proteína dimérica do NF-κB composta pelas subunidades p50 e p65 é ligada ao inibidor (Ik-B) no citoplasma, formando o Ik-Bα. Após estimulação com indutores endógenos de ativação do NF-κB, tais como IL-1β e TNF-α, ou indutores exógenos potentes, tais como LPS, Ik-Bα é rapidamente fosforilado pela quinase IkB (IKK), e é marcado para a ubiquitinação e degradação no citoplasma. O dímero de NF-κB

liberado pode então ser ativado pela fosforilação de p65 e translocado para o núcleo onde desencadeia a transcrição de genes alvos (BOWIE & O'NEILL, 2000; GHOSH & KARIN, 2002; AKTAN, 2004). O fator de transcrição AP-1, um heterodímero composto por proteínas pertencentes às famílias c-Fos, c-Jun, ATF e JDP, também está envolvido na resposta inflamatória (KUNZ et al., 2001). Após estimulação, TLRs ativam cascatas de sinalização complexas, tais como as proteínas-quinases ativadas por mitogénio (MAPK), que incluem a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), c-Jun quinase N-terminal (JNK) e a proteína 38 (p38). A fosforilação de AP-1 induz a transcrição de TNF- α , IL-1 β e metaloproteinase da matriz (KUNZ et al., 2001; HU et al., 2007). CD14 é um co-receptor de superfície de célula que coopera com TLR4 e com a proteína de diferenciação mielóide 2 (MD-2) para mediar a resposta imune inata ao LPS em macrófagos (KIRKLAND et al., 1993; DA SILVA CORREIA et al., 2001; LUCAS & MAES, 2013). A jusante do receptor tripartite (TLR4/TLR2/CD14), o recrutamento de proteínas adaptadoras contendo o domínio Toll/Interleucina-1 (TIR) (TIRAP) e o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) iniciam uma via dependente de MyD88 que culmina na ativação das vias NF- κ B e MAPK (WANG et al., 2001). Além da via dependente de MyD88, a estimulação com LPS, também resulta na ativação de uma via independente de MyD88, através do recrutamento de moléculas adaptadoras contendo o domínio TIR induzindo interferon-beta (TRIF) e molécula adaptadora TRIF-relacionada (TRAF). Isto conduz à ativação de fase tardia de NF- κ B e do fator de transcrição regulador de interferon 3 (IRF3), bem como a ativação de MAPK e da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (DAUPHINEE & KARSAN, 2006). Entretanto, as moléculas presentes nas células do sistema imune inato que reconhecem a peçonha e toxinas e os mecanismos de sinalização celular envolvidos na resposta inflamatória após o envenenamento por escorpiões permanecem desconhecidos.

1.5. PAPEL DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NA PRODUÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS POR MACRÓFAGOS

Corpúsculos lipídicos (CLs) são estruturas citoplasmáticas, não ligadas à membrana celular, morfologicamente esféricas, compostas por lipídios e proteínas (BOZZA et al., 2011). CLs são encontrados em diferentes tipos de células, incluindo os macrófagos, e participam do metabolismo lipídico, da produção de mediadores inflamatórios, do tráfego de membrana e da sinalização intracelular (BANDEIRA-

MELO et al., 2002; MARTIN & PARTON, 2006; BOZZA et al., 2007). Estudos demonstraram que o aumento no número de CLs correlaciona-se com o aumento da produção de LTB₄, LTC₄ e PGE₂ liberados por leucócitos ativados com o ionóforo de cálcio A23187 (BOZZA et al., 1996; BOZZA et al., 1997; BOZZA et al., 1997; BANDEIRA-MELO et al., 2001; PACHECO et al., 2002). Além disso, nos processos alérgicos e infecciosos, os CLs foram caracterizados como principais locais de síntese de eicosanóides (VIEIRA-DE-ABREU et al., 2005; D'AVILA et al., 2006; PACHECO et al., 2007). Nosso grupo demonstrou que a infecção por leveduras de *Histoplasma capsulatum* induziu a formação de CLs, fato relacionado com a geração de LTB₄ e PGE₂ (SORGI et al., 2009). Estudos têm reportado que as proteínas PKC (do inglês, *protein kinase C*) (WELLER et al., 1991), PI3K (MAYA-MONTEIRO et al., 2008) e MAPKs (p38 e ERK1/2) (ANDERSSON et al., 2006; PACHECO et al., 2007) estão relacionadas com a síntese de CLs. E, recentemente, Giannotti et al. (2013) demonstraram que a enzima Lys49 do grupo da fosfolipase A2, isolada da peçonha da serpente ativou macrófagos murinos, induzindo a formação de CLs via depende de ERK1/2, PKC e PI3K (GIANNOTTI et al., 2013).

Além da participação de TLRs na formação de CLs, dados da literatura demonstraram a ativação de PPAR γ (Receptores ativados por proliferador de peroxissomo γ , do inglês, *Peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR γ), durante a infecção pelo bacilo (BCG) obtido da bactéria *Mycobacterium bovis* (ALMEIDA et al., 2014). O PPAR γ é um membro da família de receptores nucleares e funciona como regulador da transcrição de diferenciação celular, da inflamação e do metabolismo de lipídios nos macrófagos e células dendríticas (NAGY et al., 1998; CHAWLA et al., 2001). Entretanto, nada se sabe sobre os mecanismos de reconhecimento por células do sistema imune inato e a sinalização celular que estão envolvidos na formação de CLs induzido por TsV, bem como a participação de PPAR γ neste processo.

“A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles”
(Albert Einstein).

2. JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS

2. JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS

O envenenamento pela picada do escorpião *T. serrulatus* tem incidência mundial significativa, e está associado principalmente aos riscos ocupacionais. Estudos mostraram que no envenenamento humano pelo escorpião, sintomas começam a aparecer minutos após a picada, mas que, geralmente, progridem para severidade máxima dentro de 4 horas, dependendo de vários fatores (PETRICEVICH, 2010; MARCUSSI et al., 2011). As vítimas geralmente apresentam sinais e sintomas que envolvem o sistema nervoso central, estimulação do sistema nervoso autônomo, insuficiência cardíaca e respiratória e intensa reação inflamatória, principalmente pulmonar, que em conjunto podem levar o indivíduo a morte (DORCE & SANDOVAL, 1994). Deste modo, o entendimento da fisiopatologia no envenenamento por peçonha de escorpiões, é fundamental para o desenvolvimento de terapias adequadas. Trabalhos experimentais têm demonstrado que a peçonha de *T. serrulatus* e sua toxina Ts1 induzem intensa reação inflamatória (PESSINI et al., 2003). Sendo assim, tivemos como **objetivo geral** estudar a produção de mediadores inflamatórios, as vias de ativação celular e os receptores da imunidade inata responsáveis pelo reconhecimento da peçonha do escorpião *T. serrulatus*, bem como de suas toxinas.

Neste projeto tivemos como **objetivos específicos**:

- 1) Avaliar os efeitos do TsV ou das suas toxinas (Ts1, Ts2 e Ts6) em macrófagos, e avaliar o possível papel anti-inflamatório das mesmas.
- 2) Investigar a produção de mediadores lipídicos e sua contribuição para o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida pelas toxinas Ts2 ou Ts6 da peçonha do escorpião *T. serrulatus*.
- 3) Estudar os mecanismos responsáveis pelo reconhecimento de TsV e Ts1 por macrófagos, e as vias de sinalização intracelular envolvidas na indução de mediadores inflamatórios.
- 4) Investigar em macrófagos estimulados por TsV, a indução de CLs e a contribuição dos mesmos na geração de mediadores lipídicos, assim como a sinalização intracelular.

“A vida do homem é como um jogo de dados; se você não consegue a jogada que esperava, pode mostrar sua habilidade tirando o máximo da jogada que conseguiu” (Terêncio).

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Obtenção da peçonha bruta de *T. serrulatus* e de suas toxinas

TsV foi extraída do escorpião *T. serrulatus* e suas toxinas Ts1, Ts2 e Ts6 (representando 16%, 3% e 2,5%, respectivamente, do total da peçonha solúvel bruta), foram purificadas e estocada a -20°C como descrito anteriormente (ARANTES et al., 1989). Estes compostos foram cedidos pela nossa colaboradora Prof^a Dr^a Eliane C. Arantes do Departamento de Físico-Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Antes dos experimentos, TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 foram dissolvidas em PBS (salina tamponada com fosfato) e filtradas através de membranas de esterilização (0,22 μm , TPP, Spritzenfilter). Para determinar se TsV e as toxinas purificadas estavam contaminadas com LPS, foi realizado o teste de lisado amebócitos de *Limulus* (LAL, do inglês *Limulus Amoebocyte Lysate test*) (QCL-1000, BioWhittaker, Cambrex Company, Walkersville, MD, USA) e também foi feito ensaio utilizando polimixina B, que tem por finalidade se ligar e inativar possível contaminação por LPS (item 3.8.1).

Concentração inicial da amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Diluição	DO 405 nm	Concentração de endotoxina (UE/mL)	Concentração de endotoxina (EU/ μg de peçonha) *
TsV (100 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,373	0,3033	0,003033
Ts1 (100 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,237	0,1927	0,001927
Ts2 (100 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,310	0,2520	0,002520
Ts6 (100 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,370	0,3008	0,003008
TsV (50 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,245	0,1992	0,003984
Ts1 (50 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,215	0,1706	0,003412
Ts2 (50 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,341	0,2772	0,005544
Ts6 (50 $\mu\text{g/mL}$)	1	0,295	0,2398	0,004796

Tabela 2: Detecção de Endotoxina utilizando o kit QCL-1000 – LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*). Representativo das amostras utilizadas nos experimentos.* Aceitável: 0,1 EU/1 μg peçonha.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos (20 - 25 g) das linhagens selvagens: 129sv e C57BL/6 (do inglês, “*wild type*” WT) e deficientes da enzima 5-lipoxigenase (5-LOKO), provenientes do Biotério II (SPF) da Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Camundongos deficientes (do inglês, “*knockout*” KO) para as moléculas de sinalização TLR2, CD14, MyD88 e TLR4,

foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os camundongos foram mantidos em temperatura 25°C com ciclo de 12 h de luz/escuro e com acesso livre de água e comida. Todos os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética do Campus de Ribeirão Preto (PCARP) (número do Protocolo 11.1.160.53.1).

3.3. Cultivo de células de linhagem J774.1

Células da linhagem J774.1, que é uma linhagem celular de macrófagos peritoneais murinos (originário de camundongos BALB/C) (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK), foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) (RPMI-c). Após a formação das monocamadas de células, as mesmas foram removidas e centrifugadas (400 x g, 10 min., a 10 °C). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de RPMI-c para avaliação da viabilidade celular, em microscópio óptico. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada com o corante Azul de Tripán (Gibco Invitrogen, USA).

3.3.1. Ensaio de citotoxicidade em células J774.1

Uma suspensão de macrófagos J774.1 foi ajustada para $2,5 \times 10^4$ células/poços/200 µL, em meio de cultura RPMI 1640 com 5% de SBF adicionado de antibiótico. As células foram plaqueadas em microplaca de 96 cavidades e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 18 horas para a adesão. Após este período, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de meio de cultura contendo diferentes concentrações da peçonha bruta ou das toxinas. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por RPMI (200 µL/poço) sem soro e sem vermelho de fenol, mas contendo o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) 0,5 mg/mL (Sigma M-5655) (MOSMANN, 1983). As células foram incubadas nas mesmas condições por 3 horas. A absorbância referente a cada poço foi determinada a 550 nm em leitor de placas (mQuant, Biotec Instruments, Inc.).

3.3.2. Design Experimental

A viabilidade celular, a produção de citocinas e NO foram avaliados após as células serem estimuladas com TsV, Ts1, Ts2, ou Ts6 em diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg/mL), por 24 h. As concentrações foram definidas de acordo com os estudos prévios da literatura (PETRICEVICH et al., 2008). As células não estimuladas com TsV, Ts1, Ts2 ou Ts6 foram usadas como controles (RPMI-c) e consideradas 100% viáveis. Os potenciais inflamatórios e anti-inflamatórios de TsV e suas toxinas foram analisados usando células J774.1 pré-estimuladas com LPS (0,5 µg/mL) (*Escherichia coli* LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após 2 horas de estímulos com LPS, TsV ou as toxinas foram adicionadas em diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg/mL). Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi recolhido e estocado em -20 °C para posterior dosagem de NO (item 3.10.) e citocinas (item 3.11.). As células estimuladas apenas com LPS foram usadas como controles positivos.

3.4. Avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal

Para indução da reação inflamatória, 6 camundongos (129sv) receberam i.p. 300 µl de Ts2 ou Ts6 (250 µg/kg) diluídas em PBS estéril. Animais controle receberam i.p. apenas PBS estéril. Após 4, 24, 48 e 96 horas da inoculação dos estímulos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e 3 mL de PBS foram inoculados na cavidade peritoneal, a qual foi massageada gentilmente por 1 minuto. O Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) foi coletado individualmente e conservado em gelo. Para contagem do número total de células presentes no LCP, foram retiradas 20 µL de cada amostra, as quais foram diluídas em 380 µL de solução de Turk. A contagem total foi feita em Câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células presentes no lavado foi feita em esfregaços, preparados em citocentrífuga e corados pelo corante Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). Foram contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x, em microscópio óptico. Após contagem total e diferencial das células, o LCP foi centrifugado por 10 min, 10°C, 400 x g. Após esta centrifugação, o sobrenadante do LCP foi coletado e congelado a -80 °C para avaliação posterior de citocinas (item 3.11.), proteínas (item 3.5.), LTB₄ e PGE₂ (item 3.12.).

3.4.1. Injeção de Ts2 ou Ts6 em camundongos e o tratamento com celecoxibe ou MK-886

Grupos de seis camundongos de cada linhagem (129sv e 5-LO^{-/-}) foram injetados i.p. com 300 µl de Ts2 ou Ts6 (250 µg/kg) diluídas em PBS. Camundongos controles receberam 300 µl de PBS estéril. Os experimentos foram feitos duas vezes (n = 12). Grupos de camundongos 129sv foram tratados oralmente com inibidor da COX-2 ou com inibidor da proteína ativadora da 5-LO (FLAP), respectivamente, celecoxibe ou MK-886 (5 mg/kg/500 µL). O tratamento foi feito 1 dia e 1 hora antes dos camundongos receberem a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6. Para os camundongos que foram eutanasiados após 96 h da injeção i.p., o tratamento também ocorreu diariamente. Após 4 e 96 h da injeção i.p. das toxinas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o lavado peritoneal foi coletado como descrito no item 3.4.

3.5. Quantificação de proteínas

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

3.6. Obtenção de sangue para determinar o número total e diferencial dos leucócitos

As amostras de sangue foram obtidas dos camundongos previamente anestesiados com ketamina/xilasina pelo plexo de retro-orbital com o auxílio da pipeta Pasteur contendo heparina. Para contagem do número total de células presentes no sangue, foram retiradas 20 µL de cada amostra, as quais foram diluídas em 380 µL de solução de Turk. A contagem total foi feita em Câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células presentes no sangue foi feita em esfregaços, preparados em citocentrífuga e corados pelo corante Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). Foram contadas 100 células em diferentes campos, com aumento de 100x, em microscópio óptico.

3.7. Obtenção de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais de diferentes linhagens de camundongos (C57Bl/6, TLR4^{-/-}, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} e MyD88^{-/-}) foram isolados da cavidade peritoneal

de camundongos “naïves” e centrifugados por 10 min, 10°C, 400 x g. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI e a viabilidade foi determinada com Azul de Trypan (Gibco Invitrogen, USA). Após contagem, a suspensão final de células foi ajustada para 2×10^5 células/mL. As células aderentes foram cultivadas “over night” a 37 °C, 5% CO₂, em meio RPMI-c adicionado de antibiótico. Após este período, o sobrenadante foi coletado e as células foram estimuladas com TsV ou Ts1 (50 µg/mL) para os experimentos de reconhecimento de TsV ou Ts1 por PRRs (item 3.8.) ou as células foram estimuladas com TsV (50 µg/mL) para os experimentos de indução dos CLs (item 3.9.).

3.8. Estudos *in vitro* para reconhecimento do TsV e Ts1

3.8.1. Cultivo de macrófagos peritoneais

Para verificar por outra ferramenta a possível contaminação da peçonha por LPS, os macrófagos aderentes da linhagem C57Bl/6 foram pré-tratados com polimixina B (Sigma Aldrich), que tem por finalidade se ligar e inativar o LPS, e em seguida, foram estimulados com TsV (50 µg/mL) por 24 h. O sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C para a posterior dosagem de citocinas (item 3.11.). Em outro experimento, os macrófagos peritoneais aderentes de cada linhagem (C57Bl/6, TLR4^{-/-}, TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} e MyD88^{-/-}) foram estimulados com TsV (50 µg/mL) por 30 min ou 24 h ou com Ts1 (50 µg/mL) por 24 horas a 37 °C, 5% CO₂. Após estes períodos, o sobrenadante foi recolhido e guardado em -20°C para posterior dosagem de citocinas (item 3.11.) e mediadores lipídicos (item 3.12.).

3.8.2. Ensaio para verificar se o reconhecimento de TsV ou Ts1 por macrófagos são dependentes de suas estruturas terciárias

Para este ensaio TsV ou Ts1 foram inativadas termicamente, ou seja, pelo calor, antes de adicioná-las às células. Para inativação, 50 µg/mL de TsV ou Ts1 foram aquecidas durante 30 min a 60 °C (PESSINI et al., 2001), e para a desnaturação, TsV ou Ts1 foram fervidas a 95 °C durante 60 min. Após estes procedimentos, os macrófagos aderentes foram estimulados com TsV ou Ts1 (pré-aquecidas), por 24 h a 37 °C, 5% CO₂. Os sobrenadantes foram recolhidos para a quantificação de IL-6 e TNF-α por ELISA (item 3.11).

3.8.3. Avaliação da integridade da membrana celular

Para verificar a citotoxicidade, os macrófagos peritoneais aderentes da linhagem C57Bl/6 foram estimulados com TsV nas diferentes concentrações de 25, 50, 100 e 150 µg/mL, por 24 h. Após este período, o sobrenadante foi recolhido e adicionado 200 µL/poço do meio RPMI sem soro e sem vermelho de fenol, mas contendo o corante MTT 0,5 mg/mL (Sigma M-5655). As células foram incubadas por 4 h a 37 °C, 5% CO₂. A absorbância referente a cada poço foi determinada a 550 nm em leitor de placas (mQuant, Biotec Instruments, Inc.). Em outro experimento independente, utilizamos um kit de ensaio, que avalia a injúria celular, através da enzima lactato desidrogenase (LDH). A LDH é uma enzima citosólica estável que é liberada após a lise celular. O nível de LDH no sobrenadante das células foi quantificado após 24 h de incubação com TsV ou Ts1 (50 µg/mL), usando o kit *CytoTox96H non-radioactive assay* (Promega, USA). A absorbância referente a cada poço foi determinada a 490 nm em leitor de placa (mQuant, Biotec Instruments, Inc.). Níveis de LDH foram expressos como porcentagem dos níveis de LDH em cada amostra e normalizados pelo controle do kit, que corresponde a 100% de LDH liberado.

3.9. Indução de corpúsculos lipídicos

Os macrófagos peritoneais aderentes das linhagens C57Bl/6, TLR4^{-/-} e TLR2^{-/-} foram obtidos como descrito no item 3.7 e plaqueados (2 x 10⁵ células/poço) em microplacas, slides de 8 poços (BD Bioscience). Após o período de aderência, as células foram pré-tratadas ou não com o antagonista do receptor de PPAR-γ (GW9662, Caymann, USA) durante 30 minutos. Após este tempo, as células foram estimuladas ou não com TsV (50 µg/mL) por 30 min, 4 ou 24 h a 37 °C, 5% CO₂. Após os diferentes tempos de estímulos com TsV, os sobrenadantes foram coletados e guardados em -20 °C para posterior dosagem de citocinas (item 3.11.) e os macrófagos aderentes foram preparados para avaliar a formação dos CLs (item 3.9.1.) ou foram adicionados nos poços, 200 µL da solução salina balanceada de Hank's acrescida de Ca²⁺ e Mg²⁺ (do inglês, HBSS, *Hanks' Balanced Salt Solution*) contendo 0,5 µM de ionóforo de cálcio (ionophore A23187, Sigma-Aldrich), por 15 minutos (tempo suficiente para romper a membrana da célula e liberar os mediadores lipídicos), e, após este período o sobrenadante foi recolhido e guardado no -20 °C para posterior dosagem de LTB₄ e PGE₂ (item 3.12.).

3.9.1. Coloração e contagem de CLs

Para coloração e contagem de CLs, os macrófagos foram fixados em solução de formaldeído 3,7% (v/v) diluído em solução salina balanceada de Hanks- HBSS (sem Ca^{2+} e Mg^{2+} ; pH 7.4) (GibcoBRL, New Yourk, USA) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem em água destilada por 5 vezes, 200 μL de tampão cacodilato 0,1 M (pH = 7.4) (Acros, New Jersey, EUA) foram adicionado juntamente com 200 μL de solução de tetróxido de ósmio 1,5% (OsO_4) (m/V) (Sigma, st. Louis, USA) diluído em tampão cacodilato, e foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, livre de luz. Após lavagem por imersão em água destilada, foram adicionados 300 μL de solução de tiocarbohidrazina 1% (Sigma, St. Louis, USA) diluído em água destilada por 5 min a temperatura ambiente, seguido de nova lavagem. Para uma melhor fixação do corante, foram novamente adicionados 200 μL de tampão cacodilato 0,1 M, juntamente com 200 μL de solução de OsO_4 1,5% por 3 minutos a temperatura ambiente, livre de luz. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas em água destilada, e após, foram secadas e montadas para posterior análise. A morfologia das células foi observada e os corpúsculos lipídicos contados em microscópio óptico de campo claro com objetiva de 100x (Zeiss, standart 25 ICS). Para evitar a interferência humana na contagem, os slides foram marcados com códigos obscuros para a pessoa responsável. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata e 50 células foram contadas em cada slide.

3.10. Determinação da concentração de Nitrito

A detecção de NO nos sobrenadantes de cultura de células J774.1 estimuladas foi avaliada indiretamente pela quantificação de nitrito (NO^-) através do método de Griess (GREEN et al., 1981), empregando filtro de 540 nm.

3.11. Determinação da concentração de citocinas

Os sobrenadantes de cultura obtidos de linhagem celular (J774.1), dos macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* e do fluido peritoneal livre de células obtidos do camundongos 129sv injetados com Ts2 ou Ts6 foram usados para quantificar citocinas (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-4 e IFN- γ , KC) pelo método de ELISA. Foram utilizados anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e proteínas recombinantes, de acordo com instruções do fabricante (R & D Systems,

MN, e PharMingen, San Diego, CA). A leitura da densidade óptica foi feita em 450 nm (mQuant, Biotek Instruments Inc.) e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão. O limite de detecção foi > 10 pg/mL. Para as amostras do fluido peritoneal, os resultados foram expressos em pg/mg de proteína total.

3.12. Determinação da concentração de mediadores lipídicos

LTB₄ e PGE₂ foram quantificados nos fluidos peritoneais livre de células dos camundongos 129sv injetados com Ts2 ou Ts6, nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com TsV ou Ts1, e posteriormente, estimulados ou não com ionóforo de cálcio por 15 minutos, pelo ensaio Imunoenzimático Competitivo de acordo com as instruções do fabricante (EIA, Cayman, USA). As absorbâncias foram determinadas em leitor de placa em 405/420 nm (μQuant, biotek Instruments Inc.). As concentrações de eicosanóides foram calculadas a partir da curva padrão. O limite de detecção foi > 13 pg/mL.

3.13. Imunofenotipagem de células do lavado peritoneal

A expressão de CD3, CD4, CD8, F4/80 e GR1 em células do LCP dos camundongos 129sv injetados com Ts2 ou Ts6, com ou sem o tratamento com celecoxibe ou MK-886, foi determinada pela citometria de fluxo usando anticorpos conjugados com fluorocromos (BD Biosciences, NJ, USA). Controles específicos de murino de isotipo IgG2a foram utilizados para a ligação não específica. Células peritoneais foram lavadas com PBS contendo 2% de soro bovino fetal e, após a centrifugação a 400 x g, o “*pellet*” foi fixado com PBS contendo 1 % de paraformaldeído (w/v). A aquisição foi feita por citometria de fluxo (FACSCanto, Becton Dickinson, e software FACSDiva, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido seguindo o protocolo.

3.14. Análise, por qRT-PCR, da expressão gênica em macrófagos obtidos de camundongos C57Bl/6

Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos C57BL/6 como descrito no item 3.7. As células foram plaqueadas (1×10^6 /mL) em placa de 12 poços e incubadas com TsV (50 μg/mL) por 30 min, 4 ou 24 h, a 37 °C, 5% CO₂. Após estes períodos, foi adicionado tampão de lise e o RNAm foi isolado através do Kit RNeasy (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza do

RNA extraído foram avaliadas no equipamento NanoDrop (NanoDrop, ThermoScientific). Um micrograma do RNA extraído foi usado para obtenção do cDNA através do Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. A expressão dos genes *Tlr2* (*Toll like receptor 2*), *Tlr4* (*Toll like receptor 4*), *Cd14* (molécula CD14), *MyD88* (Myeloid differentiation primary response gene 88), *Ltb4r1* (leukotriene B₄ receptor 1), *Alox5* (Arachidonate 5-Lipoxygenase), *Alox5ap* (Arachidonate 5-Lipoxygenase-Activating Protein), *Ptgs2* (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 or Cyclooxygenase-2), *Ptges2* (Prostaglandin E synthase) foi avaliada empregando o Kit RT² Profiler PCR Array (Quiagen Inc.) e o equipamento de Real-Time PCR (Eppendorf), o gene *Pparg* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) foi avaliado empregando o kit Kit RT-PCR (Quiagen). Os *primers* foram utilizados juntamente com o fluoróforo SYBR® Green (SYBR® Green PCR Master Mix; Applied Biosystems). Neste PCR array os *primers* foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (RT² Profiler PCR Array; Quiagen Inc.) A amplificação foi realizada a 95°C por 10 minutos para ativação da polimerase, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA, 65°C por 15 segundos para anelamento do *primer* e polimerização. Para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação, foi empregado um ciclo final de 1,5 horas, com temperatura crescente de 60 a 95°C. Os valores da expressão gênica foram normalizados pelos valores da expressão dos genes de *Gapdh* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *Tbp* (tubulina) e *Actb* (β-actina).

O gene *Pparg* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) foi avaliado empregando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems) e o equipamento de Real-Time PCR (StepOne Plus, Applied Biosystems). Neste sistema, os *primers* e sondas foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA e 60°C por 1 minuto para anelamento do *primer* e polimerização. Os valores da expressão gênica foram normalizados pelos valores da expressão dos genes de *Gapdh* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) e *Actb* (β-actina). Para a construção do gráfico, a expressão gênica

dos macrófagos da linhagem C57BL/6 foi considerada a amostra referência, sendo o $2^{-\Delta\Delta CT}$ igual a 1.

3.15. Ativação do NF- κ B

As células RAW-Blue^{TM} são macrófagos (RAW264.7) estavelmente transfectados com o gene repórter NF- κ B e quando ativados secretam a fosfatase alcalina embrionária, SEAP (do inglês, *secreted embryonic alkaline phosphatase*). Estas células foram doadas gentilmente pelo Dr. Huy Ong (Université de Montréal, Canada). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com densidade de 2×10^5 células/poço em meio DMEM suplementado com Normocin^{TM} (50 mg/mL) e cultivado a 37 °C, 5 % CO₂ por 18 h. Após este período, as células foram incubadas com 10 ng/ml de LPS de *Rhodobacter sphaeroides*, um antagonista para TLR4 (LPS-RS - InvivoGen) por 30 min, com adição ou não de LPS derivado de *E. coli* (0,5 µg/mL), TsV (50 µg/mL) ou Ts1 (50 µg/mL) por 24 h. Em outro experimento, as células foram pré-incubadas com 100 ng/mL de anticorpo IgG monoclonal purificado contra camundongos para TLR2 (anti-mTLR2-IgG – InvivoGen) por 30 min e então, estimulados ou não com LPS derivado de *E. coli* (0,5 µg/mL), TsV ou Ts1 (50 µg/mL) por 24 h. Após 24 h de estimulação, o meio foi retirado, e em cada 50 µL de cada amostra foi adicionado 150 µL QUANTI-Blue^{TM} (InvivoGen), que é um meio de detecção de SEAP, em placas de 96 poços a 37°C por 2 h. A densidade óptica foi medida em 650 nm usando leitor de placa (µQuant, biotek Instruments Inc.).

3.16. Imunoensaio de proteínas fosforiladas

Para avaliar os níveis de fosforilação das proteínas (NF- κ Bp65, c-Jun, I κ B α) capazes de ativar a via inflamatória em macrófagos, utilizamos o kit *Pathscan ELISA* (*PathScan Inflammation Multi-Target Sandwich ELISA Kit*, Cell Signaling Technology, Inc., USA). Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos como descrito no item 3.7. As células foram estimuladas com TsV ou Ts1 (50 µg/mL) por 10 min, 2 ou 24 h a 37 °C, 5 % CO₂. Após o tratamento, os macrófagos peritoneais aderentes foram lavados com PBS gelado, e, em seguida, o tampão de lise mais inibidores de proteases e fosfolipases foram acrescidos. A placa foi incubada durante 5 min em banho de gelo. As células foram desprendidas e transferidas para um eppendorf, e cada lisado foi sonificado. Os lisados foram centrifugados a 11.000 x g durante 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi armazenado

em um novo eppendorf em -80°C até o dia do ensaio. O conteúdo de proteína de cada lisado foi determinado pelo método de Bradford (Pierce, Rockford, USA) para reajustar todas as amostras pela concentração protéica. Resumidamente, os lisados foram diluídos com reagente diluente, conforme instruções do fabricante, e foram adicionados aos poços apropriados que continham os anticorpos de interesse correspondente. A placa foi incubada 'overnight' a 4°C . Após este período, os poços foram lavados com tampão de lavagem por quatro vezes. Em seguida, foi adicionado aos poços, os anticorpos de detecção e os procedimentos de incubação foram feitos conforme intruções do fabricante (Cell Signaling Technology, Inc., USA). A leitura das amostras foi feita em leitor de placa para ELISA em 450 nm (mQuant, Biotek Instruments Inc.). Os resultados estão expressos como a porcentagem da quantidade relativa de proteína de cada amostra e normalizados pelo controle positivo do kit, que corresponde a 100% de fosforilação.

3.17. Análise de proteínas quinases (MAPKs) por *Cytometric Read Array flex sit*

Os macrófagos peritoneais provenientes de camundongos C57Bl/6 foram plaqueados em placas de 12 poços como descrito no item 3.7. Células foram estimuladas com 1 mL de TsV ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$) por 15, 30, 60 e 120 minutos e incubadas a 37°C , 5% CO_2 . O meio RPMI (sem SBF) foi usado como controle negativo. Após tratamento, macrófagos aderentes foram removidos com o tampão de lise contendo inibidores de proteases e fosfatases. O lisado celular foi transferido para um eppendorf, seguido por um banho a 100°C por 5 minutos. A concentração de proteína total foi ajustada para $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As amostras foram preparadas seguindo as instruções do fabricante (BD™ Bioscience, CA). pJNK1/2 (T183/Y185), pp38 (T180/Y182) e pERK1/2 (T202/Y204) foram quantificadas usando anticorpos do kit *multiplex Flex Set Cytometric Bead Array* (CBA) (BD™ Bioscience, CA). Para cada tubo foi transferido $50\text{ }\mu\text{L}$ do mix das *beads* marcadas com anticorpos, uma vez que cada *bead* tem intensidade de fluorescência específica. Após 3 h de incubação à temperatura ambiente, $50\text{ }\mu\text{L}$ do reagente de detecção foi adicionado e as amostras foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. O volume de $300\text{ }\mu\text{L}$ do tampão de lavagem foi adicionado nos tubos seguidos por uma centrifugação de $400 \times g$ por 5 min. A aquisição das amostras foi feita por citometria de fluxo (FACS Canto, Becton Dickinson, e para a análise foi utilizado o software FACSDiva, EUA). Um total

---

de 900 eventos foram adquiridos. O mínimo de detecção de fosforilação foi de 0.38 U/ml para pJNK, e 0.64 U/ml para pp38 e pERK.

3.18. Análises Estatísticas

Foi utilizado o teste ANOVA (não paramétrico) seguido pelo pós-teste Newman-Keuls para a análise de todos os resultados, exceto para a análise de PCR que foi utilizado o pós-teste Dunnett's. Para duas amostras não pareadas, foi utilizado o test *t*-Student. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

“O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim para que elas venham até você”
(Mário Quintana).

4. RESULTADOS

PARTE 1: Estudos sobre a ativação e indução da produção de mediadores inflamatórios por macrófagos estimulados com TsV, Ts1, Ts2 e Ts6.

Estratégias:

Linhagens celulares de macrófagos peritoneais (J774.1) foram estimuladas com TsV ou com as toxinas (Ts1, Ts2 e Ts6), na presença ou ausência de LPS, para:

- Avaliar a citotoxicidade celular.
- Determinar a produção de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10) e NO.

4.1.1. Ensaio *in vitro* de citotoxicidade da peçonha bruta do escorpião *T. serrulatus* e de suas toxinas isoladas

A citotoxicidade do TsV e de suas toxinas (Ts1, Ts2 e Ts6) foram analisadas *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais da linhagem J774.1. A redução do sal de tetrazólio MTT para formazan, um cristal azul solúvel em isopropanol, foi utilizada para avaliar o funcionamento/metabolismo das mitocôndrias das células, uma vez que a quantidade de formazan produzida é proporcional à quantidade de células viáveis. As células na presença da concentração máxima da peçonha ou das toxinas mantiveram viabilidade superior a 88% (Figura 3). Com base nestes resultados e em outros da literatura, prosseguimos nossos experimentos com as concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 3. Avaliação da citotoxicidade de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 pelo MTT em macrófagos peritoneais. A suspensão de macrófagos J774.1 foi ajustada para $2,5 \times 10^4$ células/poço em meio de cultura com 5% de soro bovino fetal e incubadas por 24 horas com 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de TsV ou das toxinas Ts1, Ts2 e Ts6. A análise estatística foi avaliada pelo teste ANOVA. * $p < 0,05$ quando comparado com as células sem estímulos, cuja viabilidade foi igual a 100%.

4.1.2. Determinação da concentração de Nitrito presente nos sobrenadantes de cultura de células J774.1 estimuladas com a peçonha bruta ou as toxinas

A produção de NO foi determinada a partir da detecção de nitrito (NO_2^-) como um parâmetro de ativação de macrófagos estimulados com TsV, Ts1, Ts2 ou Ts6 em diferentes concentrações (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), na presença ou ausência de LPS (Figura 4).

Na ausência de LPS, as células J774.1, não produziram quantidades significativas de NO quando estimuladas somente com TsV ou Ts6 (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), e Ts1 (em todas as concentrações), comparada com o controle (RPMI-c), como mostrado na figura 4. Entretanto, as células estimuladas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de TsV ou Ts6 produziram NO, enquanto que, as células estimuladas com Ts2 inibiram a liberação de NO, comparado com o controle (RPMI-c) (Fig. 4E). Já, na presença de LPS, células J774.1 estimuladas com TsV em todas as concentrações usadas (Fig. 4B), com Ts1 (100 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 4D) e Ts6 (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 4H) apresentaram aumento na produção de NO quando comparado com o LPS sozinho. Interessantemente, Ts2 (25 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a liberação de NO induzida pelo LPS (Fig. 4F). Assim, a produção de NO induzida por TsV, Ts1 e Ts6 pode ser potencializada na presença de LPS.

Figura 4. Efeitos de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 sobre a produção de NO na ausência ou presença de LPS. Macrófagos peritoneais aderentes (J774.1) foram estimulados com TsV (A), Ts1 (C), Ts2 (E) ou Ts6 (G) e o sobrenadante foi coletado após 24 horas de incubação. Em outro experimento, as células aderentes foram pré-estimuladas com LPS (0,5 μg/mL), e após 2 horas, TsV (B), Ts1 (D), Ts2 (F) ou Ts6 (H) foram adicionados. O sobrenadante foi coletado após 24 horas. A quantidade de NO presente no sobrenadante foi determinada pela reação de Greiss. Os resultados são expressos como média±SEM (n = 8) de dois experimentos diferentes. *p < 0,05; **p < 0,005 e ***p < 0,0001 comparado com as células sem estímulos (A, C, E e G) ou com a linha tracejada (B, D, F e H – representa células sem estímulo); #*p* < 0,05; ##*p* < 0,005 comparado com LPS (0,5 μg/mL), utilizando o teste one-way ANOVA.

4.1.3. Determinação da concentração de citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura de células J774.1 estimuladas com a peçonha bruta ou as toxinas

Considerando que a peçonha e as toxinas foram capazes de induzir a produção de NO, nosso próximo passo foi investigar a capacidade dos macrófagos peritoneais em produzir citocinas, tais como, TNF- α , IL-6 e IL-10. Nas figuras 5-7 estão reportadas as mudanças relacionadas à liberação de TNF- α , IL-6 e IL-10, respectivamente. Como mostrado na figura 5, TsV (50 e 100 μ g/mL) (Fig. 5A), Ts1 (100 μ g/mL) (Fig. 5C), Ts2 (em todas as concentrações) (Fig. 5E), estimularam as células J774.1 a produzir TNF- α quando comparados ao controle. Por outro lado, Ts6 inibiu a liberação de TNF- α nas concentrações de 25 e 50 μ g/mL (Fig. 5G). Entretanto, na presença de LPS, quando as células J774.1 foram estimuladas com TsV em todas as concentrações (Fig. 5B), Ts1 (Fig. 5D) ou Ts6 (Fig. 5H) na concentração de 100 μ g/mL, houve aumento na produção de TNF- α induzido pelo LPS. Por outro lado, Ts2, em todas as concentrações usadas, inibiu a liberação de TNF- α (Fig. 5F).

A figura 6 mostra a liberação de IL-6 induzida pela peçonha e suas toxinas. Comparado com RPMI-c sozinho, TsV (Fig. 6A) ou Ts1 (Fig. 6C) em todas as concentrações ou Ts6 nas concentrações de 50 e 100 μ g/mL (Fig. 6G) induziram a produção de IL-6 pelas células J774.1. Na presença de LPS, a liberação de IL-6 pelas células J774.1 foi acentuada após a adição de TsV (em todas as concentrações) (Fig. 6B), Ts1 ou Ts6 (100 μ g/mL) (Fig. 6D e 6H, respectivamente), comparada com o LPS sozinho. Também notamos que Ts2 diminuiu a liberação de IL-6 induzida pelo LPS (Fig. 6F). Estes resultados em conjunto sugerem uma atividade pró-inflamatória para Ts1 e Ts6, e anti-inflamatória para Ts2 em determinadas concentrações.

Figura 5. Efeitos de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 sobre a produção de TNF- α na ausência ou presença de LPS. Macrófagos peritoneais aderentes (J774.1) foram estimulados com TsV (A), Ts1 (C), Ts2 (E) ou Ts6 (G) e o sobrenadante foi coletado após 24 horas de incubação. Em outro experimento, as células aderentes foram pré-estimuladas com LPS (0,5 μ g/mL), e após 2 horas, TsV (B), Ts1 (D), Ts2 (F) ou Ts6 (H) foram adicionados. O sobrenadante foi coletado após 24 horas. A quantidade de TNF- α presente no sobrenadante foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 8) de dois experimentos diferentes. * p < 0,05; ** p < 0,005 e *** p < 0,0001 comparado com as células sem estímulos (A, C, E e G) ou com a linha tracejada (B, D, F e H – representa células sem estímulo); # p < 0,05; ## p < 0,005 e ### p < 0,0001 comparado com LPS (0,5 μ g/mL), utilizando o teste one-way ANOVA.

Figura 6. Efeitos de TsV, Ts1, Ts2 e Ts6 sobre a produção de IL-6 na ausência ou presença de LPS. Macrófagos peritoneais aderentes (J774.1) foram estimulados com TsV (A), Ts1 (C), Ts2 (E) ou Ts6 (G) e o sobrenadante foi coletado após 24 horas de incubação. Em outro experimento, as células aderentes foram pré-estimuladas com LPS (0,5 µg/mL), e após 2 horas, TsV (B), Ts1 (D), Ts2 (F) ou Ts6 (H) foram adicionados. O sobrenadante foi coletado após 24 horas. A quantidade de IL-6 presente no sobrenadante foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média±SEM (n = 8) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0001$ comparado com as células sem estímulos (A, C, E e G) ou com a linha tracejada (B, D, F e H – representa células sem estímulo); # $p < 0,05$; ## $p < 0,005$ comparado com LPS (0,5 µg/mL), utilizando o teste one-way ANOVA.

A IL-10, uma das citocinas responsáveis pelo controle da resposta imunológica, também teve sua concentração determinada pelo mesmo método. Na figura 7A, demonstramos que Ts2 (100 µg/mL), na ausência de LPS, promoveu aumento na liberação de IL-10 pelas células J774.1. Entretanto, na presença de LPS, Ts2 não alterou a produção desta citona pelas células (Fig. 7B). Ts1 e Ts6 não induziram a liberação de IL-10.

Figura 7. Efeitos de Ts2 sobre a produção de IL-10 na ausência ou presença de LPS. Macrófagos peritoneais aderentes (J774.1) foram estimulados com Ts2 (A) e o sobrenadante foi coletado após 24 horas de incubação. Em outro experimento, as células aderentes também foram pré-estimuladas com LPS (0,5 µg/mL), e após 2 horas, Ts2 (B) foi adicionado. O sobrenadante foi coletado após 24 horas. A quantidade de IL-10 presente no sobrenadante foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média±SEM (n = 8) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ comparado com as células sem estímulos (A) ou com a linha tracejada (B – representa células sem estímulo), utilizando o teste one-way ANOVA.

Discussão

O envenenamento por escorpiões é um problema de saúde pública importante. Após o envenenamento, a liberação de citocinas pode contribuir para a inflamação e ativação de macrófagos, bem como para indução da resposta imune (PETRICEVICH, 2010). Assim, começamos a nossa história investigando o papel *in vitro* do TsV e de suas toxinas Ts1, Ts2 e Ts6 em macrófagos. Inicialmente observamos a citotoxicidade da peçonha bruta e das toxinas e verificamos que os macrófagos peritoneais da linhagem (J774.1) na presença da concentração máxima do TsV ou das toxinas (100 µg/mL) mantiveram viabilidade superior à 88%. Este fenômeno não interferiu com a ativação de macrófagos e produção de mediadores inflamatórios, por apresentarem efeitos similares aos resultados que foram observados com as concentrações de 25 e 50 µg/mL. Assim, as concentrações foram consideradas apropriadas para os experimentos subseqüentes.

NO e citocinas estão envolvidos em importantes reações biológicas como no envenenamento severo, choque séptico e hipertensão, e estes efeitos sobre a resposta inflamatória são dependente da concentração (GRISHAM et al., 1999; Petricevich, 2010; (PETRICEVICH & PENA, 2002). A produção de NO e citocinas foram avaliados nos sobrenadantes dos macrófagos estimulados com TsV ou toxinas em combinação ou não com LPS. Verificamos que as células da linhagem J774.1 produziram NO, TNF- α e IL-6 quando estimuladas pelo TsV ou pelas toxinas. Nos experimentos onde o LPS foi utilizado, observamos aumento da produção destes mediadores inflamatórios quando comparados com somente TsV, Ts1 ou Ts6, sugerindo um efeito aditivo. No entanto, Ts2 inibiu a produção de NO, IL-6 e TNF- α induzida pelo LPS, sendo que quando utilizamos somente Ts2 na ausência de LPS, observamos maior produção de IL-10, sugerindo atividade anti-inflamatória para esta toxina. Em adição aos efeitos inflamatórios e anti-inflamatórios, é importante considerar os mecanismos de atividade das toxinas. Entretanto, é necessário mais estudos para correlacionar os efeitos das toxinas sobre a produção de citocinas e a sua ligação aos canais iônicos. Sabe-se que as neurotoxinas que atuam em canais para sódio, tais como Ts2 e Ts1, têm sido divididas em dois tipos, α e β , de acordo com as suas propriedades farmacológicas. As α -neurotoxinas reduzem ou bloqueiam o canal de inativação, prolongando a fase de repolarização, enquanto as β -neurotoxinas alteram a dependência da voltagem para potenciais

---

mais negativos, promovendo potenciais de ações contínuos e espontâneos (POSSANI et al., 1999). Ts6 pode bloquear canais voltagem-dependente para potássio (RODRIGUES et al., 2003). Assim, podemos sugerir que a produção de citocinas estimuladas por toxinas é independente das interações dos canais iônicos. Isto é suportado pelo fato de Ts1 e Ts2 se ligaram em canais para Na⁺ e apresentarem efeitos opostos em relação à produção de NO, TNF- α , IL-6 e IL-10. Além disso, Ts1 e Ts6 mostraram efeitos similares, apesar do fato de que eles agem em canais iônicos para Na⁺ e K⁺, respectivamente.

Nosso próximo passo foi avaliar o papel dos mediadores lipídicos no recrutamento de células induzida por Ts2 e Ts6, visto que dados da literatura demonstraram que TsV e Ts1 induzem resposta imune sistêmica e local (Pessini et al., 2003).

PARTE 2: Estudo da produção de mediadores lipídicos e sua contribuição para o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida pelas toxinas Ts2 ou Ts6 da peçonha do escorpião *T. serrulatus*.

Para tanto avaliamos:

- O recrutamento celular para a cavidade peritoneal e a contagem de células na corrente sanguínea;
- A formação de edema, através do extravasamento protéico;
- A produção de PGE₂ e LTB₄ no lavado peritoneal;
- A liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4, KC, TGF- β e NO) no lavado peritoneal;
- A imunofenotipagem das células do lavado peritoneal.

4.2.1. Avaliação do recrutamento de células e aumento de proteína total na cavidade peritoneal

A resposta à injeção i.p. de Ts2 ou Ts6 em camundongos foi primeiramente estudada pela avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal. Ts2 ou Ts6 inoculadas i.p. em camundongos induziram recrutamento de leucócitos (Fig. 8A), principalmente de neutrófilos (Fig. 8B) para a cavidade peritoneal por todo o período estudado (4, 24, 48 e 96 horas). As células mononucleares foram aumentadas após 4 e 96 horas da injeção i.p. de Ts2 quando comparada com os camundongos inoculados com PBS. Ts6 induziu aumento do número de células mononucleares apenas em 96 horas após a injeção i.p. da mesma (Fig. 8C). Para avaliar o edema, nós determinamos a quantidade de proteína no lavado peritoneal de camundongos inoculados i.p. com Ts2 ou Ts6 (Fig. 9). A concentração de proteínas totais teve pico entre 24 e 48 horas e, decaiu em 96 horas após a injeção de Ts2 ou Ts6 quando comparada ao controle (Fig. 9). Esses resultados juntos demonstraram que Ts2 ou Ts6 induziram resposta inflamatória na cavidade peritoneal, principalmente durante as primeiras 24 horas.

Figura 8. Recrutamento de leucócitos (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) induzido pela injeção i.p. de Ts2 ou Ts6. As células da cavidade peritoneal de camundongos foram recuperadas 4, 24, 48 e 96 horas após inoculação de Ts2 ou Ts6 (250 $\mu\text{g/kg}$). Animais controles foram inoculados com PBS. Resultados expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$), representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ comparado com PBS, utilizando o teste one-way ANOVA.

Figura 9. Ts2 ou Ts6 induzem edema na cavidade peritoneal de camundongos. Animais receberam i.p. Ts2 ou Ts6 (250 µg/kg) e foram eutanasiados após 4, 24, 48 e 96 horas e o lavado peritoneal foi recolhido e guardado no freezer -80°C até o momento de uso. Animais controles foram inoculados com PBS. Resultados expressos como média $\pm$ SEM (n = 8), representativo de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com PBS, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.2.2. Determinação de citocinas presentes no fluido peritoneal após a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6

A resposta inflamatória é desencadeada por uma cascata que inclui elementos celulares e liberação de mediadores. Assim, as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-10 e IL-4 tiveram suas concentrações determinadas no lavado peritoneal de camundongos que receberam Ts2 ou Ts6 (250 µg/kg) i.p. por diferentes tempos.

A figura 10 mostra as concentrações de citocinas em picogramas (pg) liberadas pelas células da cavidade peritoneal em relação com a quantidade de proteínas totais em miligrama (mg) presentes na cavidade peritoneal. Observamos que nas primeiras 4 horas o estímulo Ts2 induziu a produção de IL-6 (Fig. 10A), IFN- γ (Fig. 10D) e IL-10 (Fig. 10E); em 24 horas, ocorreu a liberação apenas de IL-10 (Fig. 10E); em 48 horas, verificamos aumento na produção de IFN- γ (Fig. 10D), IL-10 (Fig. 10E) e IL-4 (Fig. 10F); enquanto que, em 96 horas, ocorreu a liberação de TNF- α (Fig. 10B), IL-1 β (Fig. 10C) e IL-10 (Fig. 11E) em relação ao PBS (grupo controle). Quando Ts6 foi injetada, observamos aumento de IL-6 (Fig. 10A), TNF- α (Fig. 10B), IL-1 β (Fig. 10C) e IFN- γ (Fig. 10D) após 4 horas. Entretanto, após 24 horas, houve aumento apenas de IFN- γ (Fig. 10D). TNF- α e IFN- γ estavam aumentadas após 48

---

horas da injeção i.p. de Ts6 (Figs. 10B e 10D, respectivamente) e após 96 horas observou-se aumento apenas de TNF- α (Fig. 10B). Todas as alterações relacionadas à liberação de citocinas foram realizadas utilizando o PBS como comparação. Em conjunto, nossos resultados demonstraram uma diferença discreta no perfil de citocinas após a injeção de Ts6 comparado a injeção de Ts2.

Figura 10. Efeitos de Ts2 ou Ts6 sobre a produção de citocinas IL-6 (A), TNF-α (B), IL-1β (C), IFN-γ (D), IL-10 (E) e IL-4 (F). Grupos de camundongos receberam i.p. dose de 250 µg/kg de Ts2 ou Ts6. A eutanásia dos animais foi realizada após 4, 24, 48 e 96 horas da injeção i.p. das toxinas e o lavado peritoneal foi recolhido e guardado no freezer -80°C até o momento de uso. A quantidade das citocinas foi determinada por ELISA. A concentração das citocinas foi expressa através da razão entre a quantidade de citocinas (pg) pela quantidade de proteínas totais (mg). Os resultados são expressos como média±SEM (n = 8) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0005$ comparado com PBS, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.2.3. Determinação de LTB₄ e PGE₂ no fluido peritoneal

Além das citocinas, na inflamação, os mediadores lipídicos como as PGs e os LTs também podem ser produzidos. Para determinar se LTB₄ e PGE₂ foram produzidos após a injeção das toxinas, grupos de camundongos foram inoculados i.p. com Ts2 ou Ts6 e após 4, 24, 48 e 96 horas o lavado peritoneal foi coletado. Nós observamos que o pico da produção de ambos os mediadores se deu nas primeiras 4 horas após inoculação de Ts2, em relação a Ts6, este aumento foi observado após 24 horas, comparado ao controle (Fig. 11). Houve aumento significativo na produção de LTB₄ após 4, 24 e 48 horas da injeção i.p. de Ts2, seguido por diminuição em 96 horas comparada ao controle (Fig. 11A). Ts6 induziu aumento na liberação de LTB₄ por todo o período estudado (Fig. 11B). Após a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6, a produção de PGE₂ permaneceu aumentada durante todo o tempo analisado quando comparado ao controle (Fig. 11). Estes dados indicaram que a taxa de produção de prostaglandina-leucotrieno foi mantida durante o período estudado.

Figura 11. Efeito de Ts2 ou Ts6 sobre a liberação de PGE₂ ou LTB₄ na cavidade peritoneal. Grupos de camundongos receberam i.p. Ts2 (A) ou Ts6 (B) (250 µg/kg). A eutanásia dos animais foi realizada após 4, 24, 48 e 96 horas da injeção i.p. e o lavado peritoneal foi recolhido e guardado no freezer -80 °C até o momento de uso. A quantidade de PGE₂ e LTB₄ presente foi determinada por ELISA. A concentração dos eicosanóides está expresso por pg/mL. Os resultados são expressos como média±SEM (n = 8) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ (LTB₄ versus PBS); # $p < 0,05$ (PGE₂ versus PBS), utilizando o teste one-way ANOVA.

4.2.4. O recrutamento de leucócitos induzido por Ts2 ou Ts6 é parcialmente dependente da produção de prostaglandinas e de leucotrienos

Para compreender o papel que PGs e LTs desempenham no recrutamento de células para a cavidade peritoneal após a injeção de Ts2 ou Ts6, nós tratamos os camundongos com MK-886 (inibidor da FLAP) ou celecoxibe (inibidor COX-2). Camundongos 129sv tratados com MK-886 ou celecoxibe (5 mg/kg/dia) reduziram efetivamente o número de leucócitos em 4 e 96 horas comparados com camundongos que receberam apenas a injeção de Ts2, e em apenas 4 horas comparados com camundongos que receberam apenas a injeção de Ts6 (Fig. 12A). Após tratamento, neutrófilos foram reduzidos em 4 e 96 h comparados com camundongos que receberam apenas a injeção de Ts2 ou Ts6 (Fig. 12B); e as células mononucleares foram reduzidas após o tratamento, em 4 e 96 horas comparado com camundongos que receberam apenas a injeção de Ts2, e em apenas 4 horas comparado com Ts6 (Fig. 12C).

Também comparamos a resposta a Ts2 ou Ts6 em camundongos 129sv (WT) com a resposta induzida por estas toxinas em camundongos deficientes para a enzima 5-LO (5-LO^{-/-}), responsável pela síntese de LTs. Em comparação com os camundongos WT que receberam apenas a injeção de Ts2, observamos diminuição no número dos leucócitos, neutrófilos e células mononucleares em camundongos 5-LO^{-/-}, após 4 e 96 h (Fig. 12). Na falta da enzima 5-LO, houve redução do número de leucócitos e células mononucleares após 4 h da injeção com Ts6, enquanto que os neutrófilos foram diminuídos após 4 e 96 horas, comparados com os camundongos WT. Em conjunto, os nossos resultados sugeriram que o recrutamento de leucócitos induzidos por Ts2 ou Ts6, observado principalmente em neutrófilos, foi parcialmente dependente de LTs e de PGs.

Figura 12. Recrutamento de leucócitos, neutrófilos e células mononucleares induzido por Ts2 ou Ts6 é parcialmente dependente dos mediadores lipídicos. Os tratamentos foram dados um dia e uma hora antes da injeção i.p. de Ts2 ou Ts6 (250 µg/kg) e a cada 24 horas até o fim do experimento. Cada linhagem foi inoculada com Ts2 ou Ts6 (250 µg/kg) e teve o lavado peritoneal recuperado após 4 e 96 horas do estímulo. Controles receberam apenas PBS. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes ($n = 12$ por grupo). * $p < 0,001$ comparado com o grupo PBS (linha tracejada) e # $p < 0,001$ comparado com o grupo de camundongo 129sv que receberam Ts2 ou Ts6, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.2.5. Caracterização imunofenotípica de células recrutadas para a cavidade peritoneal após o tratamento com MK-886 ou celecoxibe em camundongos que receberam a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6

As populações de células obtidas após a injeção de Ts2 ou Ts6 dos camundongos tratados ou não com MK-886 ou celecoxibe, foram caracterizadas por citometria de fluxo. Foram realizadas análises utilizando imunoglobulinas anti-GR1, F4/80, CD3, CD4 e CD8. Os grupos que receberam a injeção de Ts2 ou Ts6 apresentaram aumento no número de células que expressam GR1+, um típico marcador de neutrófilos, em 4 e 96 h. Nos grupos tratados com MK-886 ou celecoxibe, o número de células GR1+ diminuiu para níveis semelhantes ao grupo que recebeu PBS em 4 h, e em 96 h, observou-se o mesmo perfil (Fig. 13A). O número de células positivas para F4/80 aumentou após administração de Ts2 ou Ts6 em comparação com PBS em 4 e 96 horas. Entretanto, o número dessas células diminuiu quando utilizado o tratamento prévio com celecoxibe ou MK-886 e posterior injeção de Ts2, em 4 horas. O mesmo ocorreu para o grupo tratado com MK-886 e que recebeu a injeção de Ts6 quando comparado com os camundongos que receberam apenas Ts6, em 96 horas (Fig. 13B).

O mesmo perfil de expressão foi observado em células positivas para CD3/CD4 e CD3/CD8. Comparado ao grupo que recebeu PBS, a expressão dos marcadores CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+ aumentou nos camundongos que receberam Ts6 em 4 e 96 horas, e Ts2, em 96 h. A expressão de CD3+/CD4+ diminuiu no grupo que recebeu a injeção de Ts6 pré-tratado com MK-886 em 4 h, e nos camundongos que receberam a injeção de Ts6 pré-tratados com celecoxibe em 96 h, quando comparado ao grupo que recebeu apenas a injeção de Ts6. Já, nos grupos dos camundongos que receberam a injeção Ts2 pré-tratado com MK-886 ou celecoxibe ocorreu diminuição da expressão de CD3+/CD4+, em 96 horas, quando

---

comparado com apenas o grupo de camundongos que receberam a injeção de Ts2 (Fig. 13C). O número de células positivas para CD3/CD8 diminuiu após o tratamento com celecoxibe ou MK-886 no grupo de camundongos que receberam a injeção de Ts6 em 4 e 96 horas, quando comparado ao grupo que recebeu apenas Ts6. O tratamento, com celecoxibe ou MK-886, no grupo dos camundongos que receberam a injeção Ts2, também induziu diminuição da expressão de CD3+/CD8+, em 96 horas, comparado com o grupo que recebeu apenas Ts2 (Fig. 13D). Estes resultados confirmam que a diminuição da porcentagem de células positivas para estes marcadores estão relacionada com o resultado observado pela contagem de células visualizadas em microscópio óptico (Fig. 12).

Figura 13. O aumento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos induzido por Ts2 ou Ts6 na cavidade peritoneal é parcialmente regulado por mediadores lipídicos. Células foram obtidas de camundongos após a injeção i.p. de PBS, Ts2 ou Ts6 com ou sem o pré-tratamento com celecoxibe ou MK-886 como descrito na seção Material e Métodos. Os marcadores utilizados foram (A) GR1+ para neutrófilos, (B) F4/80+ para macrófagos, (C) CD3+/CD4+ para linfócitos TCD4 e (D) CD3+/CD8+ para linfócitos TCD8. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM (n = 8) de dois experimentos independentes. * $p < 0,001$ comparando PBS (linha tracejada) *versus* Ts2 ou Ts6; # $p < 0,005$ comparando Ts2 ou Ts6 *versus* celecoxibe ou MK-886, utilizando o teste one-way ANOVA.

Discussão

Nosso estudo revelou duas novas descobertas surpreendentes e importantes. Em primeiro lugar, a cinética de migração celular induzida por Ts2 ou Ts6 nos permitiu caracterizar uma reação inflamatória local, com o aumento gradual do número de neutrófilos, citocinas inflamatórias (especialmente na fase inicial da resposta) e mediadores lipídicos. E, em segundo, demonstramos que o recrutamento de células é parcialmente dependente de PGs e LTs.

Sabe-se que durante a resposta inflamatória aguda, dependendo do estímulo, o primeiro evento é o recrutamento de neutrófilos, seguido pela chegada de outras células, incluindo macrófagos e linfócitos (MEDZHITOV, 2008). O elevado número de leucócitos nas vítimas de escorpionismo é parcialmente devido à ação de catecolaminas, liberadas pela peçonha do escorpião e conhecidas por induzir leucocitose (ZEGHAL et al., 2000; MAZZEI DE DAVILA et al., 2002). Nesta etapa, nós demonstramos que a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6 (250 µg/kg) em camundongos, induziu leucocitose com predominância de neutrófilos (Fig. 8). A resposta de fase aguda, também pode ser caracterizada por aumento nos níveis de proteína totais, que indicam a formação de edema (Fig. 9). Em conjunto, estes resultados corroboram com os dados da literatura que indicam que o aumento de proteína total, juntamente com a leucocitose na cavidade peritoneal, é uma característica da resposta inflamatória local (PETRICEVICH, 2010; MARCUSSI et al., 2011).

Após a injeção da peçonha, uma variedade de citocinas é liberada e o resultado da resposta inflamatória é ditada por certo número de fatores que incluem a duração do estímulo e o balanço entre as respostas pró e anti-inflamatórias (PETRICEVICH, 2010). Aqui, observa-se que Ts2 pode induzir o recrutamento de neutrófilos para o local de interesse (Fig. 8) e também estimular a produção da citocina regulatória IL-10 (Fig. 10). Estes resultados divergem parcialmente com as nossas descobertas *in vitro*, onde demonstramos que Ts2 tinha potencial anti-inflamatório. No entanto, é importante saber que a expressão e a produção de moléculas pró ou anti-inflamatórias por um estímulo podem variar dependendo do microambiente utilizado no estudo (BAZZONI et al., 2010). Além disso, os comportamentos *in vivo* e *in vitro* podem ser diferentes devido a inúmeros fatores, tais como a presença de outras células residentes, que podem interferir com o local inflamado. Nós especulamos que os neutrófilos recrutados por Ts2 para a cavidade

peritoneal pode ser a principal fonte de IL-10, com base em estudos anteriores que demonstraram que os neutrófilos recrutados para o local da inflamação pulmonar, após infecção bacteriana, produziram altas quantidades de IL-10 (ZHANG et al., 2009). Assim, os nossos dados sugerem que Ts2 pode desempenhar um papel regulador importante *in vivo*, devido à sua capacidade de induzir a liberação de citocinas anti-inflamatórias e recrutar neutrófilos para a cavidade peritoneal.

Durante a inflamação, os mediadores lipídicos, tais como PGs e LTs podem ser liberados em adição às citocinas. Estes mediadores são produzidos após distúrbios na membrana que leva a um aumento do cálcio intracelular (LEWIS et al., 1990; FUNK, 2001). Nós demonstramos através de três diferentes ferramentas que o recrutamento de células induzido por Ts6 ou Ts2 para a cavidade peritoneal é parcialmente dependente dos mediadores lipídicos (Fig. 11). Em primeiro lugar, observa-se que Ts2 e Ts6 induziram a produção de PGE₂ e LTB₄. Nós sugerimos que a ativação de células culmina no aumento dos produtos das vias inflamatórias (LTs e PGs), e, possivelmente, para o aumento da atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂), uma enzima-chave envolvida na formação de ambos os mediadores lipídicos. Nossos resultados demonstraram um equilíbrio entre PGE₂ e LTB₄ e um correspondente aumento de ambos poderia ser devido à ação de citocinas liberadas em momentos anteriores. Em relação ao tratamento com MK-886, nós demonstramos que LTs, predominantemente representado por LTB₄, são necessários para potencializar a migração celular após a inoculação de Ts2 ou Ts6. Considerando que prostanóides também estão envolvidos no recrutamento celular, nós exploramos o envolvimento dos produtos derivado da COX no aumento de células. Para isto, os camundongos foram pré-tratados com um inibidor de COX-2, o celecoxibe (WARNER et al., 1999). Camundongos pré-tratados com celecoxibe tiveram diminuição na migração de células, indicando que as PGs podem estar envolvidas neste processo. Sabe-se que a secreção de mediadores lipídicos pode estar associada com o influxo de neutrófilos e ao aumento de citocinas inflamatórias (MEDEIROS et al., 1999; BAGGA et al., 2003; FERNANDES et al., 2007).

Nós também demonstramos a imunofenotipagem das células recrutadas para a cavidade peritoneal após a injeção de Ts2 ou Ts6 em camundongos pré-tratados com MK-886 ou celecoxibe. Nós observamos que houve aumento de células positivas para os marcadores GR1, F4/80, CD3, CD4 e CD8 após a injeção de Ts2 ou Ts6. Estes são os marcadores de superfície comuns utilizados para caracterizar

os neutrófilos (GR1), macrófagos (F4/80), linfócitos CD4 (CD3/CD4) e linfócitos CD8 (CD3/CD8), respectivamente (RAMALINGAM et al., 2003; PILLAI et al., 2009). Assim, este resultado reforça a observação de que os neutrófilos estão aumentados em camundongos injetados com as toxinas e mostraram que dentre as células mononucleares, houve recrutamento principalmente de macrófagos, linfócitos CD4 e linfócitos CD8. Além disso, os nossos resultados indicam que os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para a cavidade peritoneal após a injeção de Ts2 ou Ts6. Estas células juntamente com as células residentes caracterizam a resposta inflamatória, liberando mediadores inflamatórios, como citocinas, LTB₄ e PGE₂, e aumentando a quantidade de proteínas totais. Dados da literatura demonstram que estas células liberam citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e IL-4, para restabelecer a homeostasia (ZHANG et al., 2009; PETRICEVICH, 2010; MARCUSSI et al., 2011). No entanto, a liberação de grandes quantidades de mediadores inflamatórios supera os mediadores anti-inflamatórios. Subseqüentemente, os macrófagos, os linfócitos CD4 e CD8 são recrutados para restabelecer o estado de homeostase basal, num mecanismo parcialmente dependente PGs e LTs.

Em conclusão, nossos dados demonstram que tanto Ts2 ou Ts6 induziram resposta inflamatória por mecanismo dependente de produção de mediadores lipídicos e citocinas. Os dados também sugerem que Ts2 tem papel regulador na resposta inflamatória, uma vez que estimula a produção de IL-10, e, Ts6 mostrou atividade pró-inflamatória. Nossos resultados enfatizam a importância de estudos que visam compreender melhor o papel de toxinas isoladas em envenenamento. Os mecanismos e as vias de sinalização após reconhecimento do TsV, bem como novas abordagens para tratamentos alternativos, podem ser úteis para diminuir as lesões causadas por *T. serrulatus* e esta questão foi a nossa próxima etapa.

PARTE 3: Estudo dos mecanismos responsáveis pelo reconhecimento de TsV e Ts1 por macrófagos, e as vias de sinalização intracelular envolvidas na indução de mediadores inflamatórios

Para tanto avaliamos:

- Os receptores da imunidade inata e as vias de sinalização celular envolvidas na ativação de macrófagos por TsV e Ts1;
- A sinalização celular envolvida na produção de citocinas e mediadores lipídicos;
- A ativação das vias inflamatórias (NF- κ B e MAPKs).

4.3.1. TsV e Ts1 induzem a produção de citocinas e mediadores lipídicos sem afetar a viabilidade celular

Para investigar os efeitos de TsV sobre a viabilidade celular, macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos C57BL/6 e expostos à TsV durante 24 h. As concentrações (25-150 μ g/mL) de TsV utilizadas neste experimento não demonstraram efeitos citotóxicos (Fig. 14A). Nós também investigamos a injúria celular induzida por TsV e Ts1 pela quantidade de LDH liberada no sobrenadante de macrófagos. Nós observamos que a incubação de células por 24 h com TsV ou Ts1 (50 μ g/mL) não induziram ruptura da membrana, ao contrário do controle positivo, LDH do kit (Fig. 14B).

Figura 14. TsV e Ts1 não afeta a viabilidade celular. (A) Macrófagos aderentes foram estimulados por 24 h com TsV nas concentrações de 25-150 μ g/mL, a 37 °C, 5% CO₂. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT. Cada coluna representa a média de n = 8 poços de dois experimentos independentes. (B) Macrófagos aderentes foram estimulados com TsV ou Ts1 por 24 h. Após este período, a ruptura da membrana foi determinada pela liberação de LDH. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM (n = 8) de dois experimentos independentes. * p < 0,001 comparado com RPMI, utilizando o teste one-way ANOVA.

Nosso próximo passo foi investigar a capacidade de TsV e Ts1 em induzir a produção de IL-6 e TNF- α pelo macrófagos peritoneais. Nós mostramos que após 24 horas de estímulo com TsV e Ts1 ocorreu produção de IL-6 (Fig. 15A) e TNF- α (Fig. 15B) pelos macrófagos peritoneais quando comparados ao controle. Curiosamente, observamos reduções significativas de IL-6 (Fig. 15C) ou TNF- α (Fig. 15D) em macrófagos estimulados com TsV ou Ts1 previamente aquecidas a 60 °C, e observou-se também a inibição total da produção destas citocinas quando TsV e Ts1 foram pré-aquecidas a 95 °C. Em conjunto, esses resultados demonstram que a produção de citocinas induzidas por TsV ou Ts1 é dependente do reconhecimento da estrutura terciária por PRRs.

Confirmamos ainda que a liberação de citocinas observada após a adição da peçonha nas culturas de células não foi devido à presença de LPS nas preparações (dados demonstrados na tabela 2 pelo teste de LAL). E na figura 16, nós não observamos alterações na produção de TNF- α quando utilizamos polimixina B no ensaio.

Mediadores lipídicos estão envolvidos na inflamação, na regulação da resposta imunológica e em várias funções biológicas homeostáticas (MURPHY & GIJON, 2007; HARIZI et al., 2008; HAEGGSTROM & FUNK, 2011; HIRATA & NARUMIYA, 2012). Para determinar se TsV e Ts1 também induzem a produção de PGE₂ e LTB₄ nos macrófagos peritoneais, quantificamos estes mediadores lipídicos nos sobrenadantes de cultura de células após 24 h de estimulação. Nós observamos que tanto TsV quanto Ts1 induzem aumento significativo de PGE₂ e LTB₄ no sobrenadante de macrófagos peritoneais (Figs. 17A e 17B, respectivamente). No entanto, TsV induziu aumento maior de PGE₂ e LTB₄ do que em relação ao Ts1, fato este que pode estar relacionado aos diferentes componentes do TsV.

Figura 15. A inativação de TsV ou Ts1 pelo pré-aquecimento reduziram a produção de IL-6 e TNF- α em macrófagos peritoneais. (A e B) Macrófagos aderentes de camundongos C57Bl/6 (WT) foram estimulados com TsV ou Ts1 (50 μ g/ml), e o sobrenadante foi coletado 24 h após a incubação (37 °C a 5% CO₂). A quantidade de IL-6 (A) e TNF- α (B) presente no sobrenadante foi quantificada por ELISA. Células não estimuladas foram usadas como controle (RPMI). Resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 12 poços) de dois experimentos independentes. * p < 0,05 comparado com RPMI. (C e D) 50 μ g/mL de TsV ou Ts1 foram fervidas ou não a 60 °C ou 95 °C e após 24 horas de estímulos, as citocinas foram quantificadas no sobrenadante por ELISA. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM (n = 8) de dois experimentos independentes. * p < 0,001 comparado com RPMI; # p < 0,001 comparado com TsV à temperatura ambiente (TA) e & p < 0,001 comparado com Ts1 à TA, utilizando o teste one-way ANOVA.

Figure 16. A liberação de TNF- α comprova a ausência de LPS no TsV. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 foram pré-incubados com ou sem polimixina B e, estimulados com TsV (50 μ g/mL) ou LPS (1 μ g/mL). Após 24 h, a quantidade de TNF- α no sobrenadante foi determinada por ELISA. Resultados expressos como média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes ($n = 12$ poços). * $p < 0,001$ comparado com RPMI (linha tracejada), utilizando o teste one-way ANOVA.

Figura 17. TsV e Ts1 induzem liberação de PGE₂ e LTB₄ em macrófagos peritoneais. Macrófagos aderentes de camundongos C57Bl/6 (WT) foram estimulados com TsV ou Ts1 (50 μ g/ml), e o sobrenadante foi coletado 24 h após a incubação (37 °C a 5% CO₂). A quantidade de PGE₂ (A) e LTB₄ (B) presente no sobrenadante foi quantificada por ELISA. Células não estimuladas foram usadas como controle (RPMI). Resultados expressos como média $\pm$ SEM ($n = 12$ poços) de dois experimentos diferentes. * $p < 0,05$ comparado com RPMI, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.3.2. O reconhecimento de TsV e Ts1 pelos macrófagos ocorre através de TLR2, TLR4 e CD14

Devido ao aumento da produção de mediadores inflamatórios, tais como, TNF- α , IL-6, PGE₂ e LTB₄, quando as células foram estimuladas com TsV e Ts1,

nosso próximo passo, foi avaliar a expressão de genes para PRRs, moléculas adaptadoras e enzimas envolvidas no metabolismo do AA. Para este estudo, os macrófagos foram estimulados com ou sem TsV ou Ts1 durante 4 h. A análise dos macrófagos realizada por qRT-PCR revelou que a estimulação por TsV aumenta a expressão gênica de receptores (*Tlr2* e *Cd14*), molécula adaptadora (*Myd88*) e de COX-2 (*Ptgs2*) sem afetar a expressão de *Tlr4*, de proteína de ativação da 5-LO (*Alox5ap*), de receptor para LTB₄ (*Ltb4r1*) ou da enzima que participa da síntese de PGE₂ (*Ptges2*). Além disso, Ts1 aumentou a expressão dos genes *Cd14* e *Ptgs2* sem afetar a expressão gênica de *Tlr2*, *Tlr4*, *Myd88*, *Alox5ap*, *Ltb4r1* e *Ptges2*, embora este aumento da expressão foi menor do que à expressão induzida por TsV (Fig. 18).

Figura 18. TsV e Ts1 aumentam a expressão gênica de *Tlr2*, *Cd14*, *Myd88* e *Ptgs2* em macrófagos peritoneais. Macrófagos aderentes de camundongos C57Bl/6 (WT) foram incubados com TsV ou Ts1 (50 µg/ml) por 4 h. Macrófagos não estimulados foram usados como controle. As células foram lisadas e o RNA total foi extraído. qRT-PCR foi usado para determinar a expressão relativa de genes ligados à transcrição de enzimas e receptores do metabolismo lipídico, de TLRs e da proteína adaptadora. Os resultados foram normalizados pela expressão de genes de referência *Actb*, *Gapdh* e *Tbp*. O método $\Delta\Delta Ct$ foi usado para analisar os dados de qRT-PCR. * $p < 0,05$ (one-way ANOVA). Os resultados estão apresentados como quantidade relativa dos genes de dois experimentos independentes.

Sabendo que TsV induziu a liberação de IL-6 e TNF- α e a expressão gênica de *Tlr*, *Cd14* e *Myd88* em macrófagos peritoneais, nosso próximo passo foi verificar se os receptores TLR2, TLR4 e CD14 estavam envolvidos no reconhecimento de TsV e Ts1. Inicialmente, observamos que após 30 min ou 24 h a produção de IL-6 (Fig. 19A) e TNF- α (Fig. 19B) induzida por TsV (50 μ g/mL) foi significativamente menor quando foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos deficientes para TLR2, TLR4 ou CD14, em comparação com células de camundongos selvagem (C57Bl/6). Similarmente, os macrófagos peritoneais obtidos de camundongos TLR2^{-/-}, CD14^{-/-} ou TLR4^{-/-} estimulados com Ts1 (50 μ g/mL) por 24 h produziram menos IL-6 (Fig. 19C) e TNF- α (Fig. 19D) do que os macrófagos obtidos de camundongos controles C57Bl/6. Em conjunto, estes dados indicam que a liberação de citocinas inflamatórias induzida por TsV é dependente de TLR4, TLR2 e CD14, e sugerem que Ts1 é o principal componente envolvido na indução de citocinas por TsV.

Diante dos nossos resultados, nosso próximo passo foi determinar se a liberação de PGE₂ e LTB₄ induzida por TsV ou Ts1 é dependente dos mesmos receptores que estão envolvidos na produção de citocinas. Quando comparamos com o controle (RPMI), observamos aumento tanto da produção de PGE₂ quanto de LTB₄ por macrófagos peritoneais estimulados com TsV ou Ts1 por 24 h (Fig. 17). Nas figuras 19E e 19G, a produção de PGE₂ em resposta ao TsV ou Ts1, respectivamente, foi dependente de TLR4 e CD14. Notavelmente, a produção de PGE₂ por macrófagos deficientes de TLR2 foi maior do que aquela observada em macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 (Figs. 19E e 19G), fato que sugere o envolvimento de TLR2 na regulação da produção de PGE₂ (ref). Em contraste, a produção de LTB₄ induzida por TsV foi parcialmente dependente de TLR2 e TLR4 (Fig. 19F). Por outro lado, a liberação de LTB₄ induzida por Ts1 foi independente de TLR2 e TLR4, indicando que outros componentes do TsV, mas não Ts1, ativam a produção de LTB₄ por macrófagos de maneira dependente de TLR2 e TLR4. Além disso, a alta concentração de LTB₄ detectada nos sobrenadantes de macrófagos CD14^{-/-} indica que este receptor pode estar envolvido na regulação negativa da produção de LTB₄ em resposta ao TsV e Ts1.

Figura 19. TLR4, TLR2 e CD14 reconhecem TsV e Ts1 e regulam a produção de IL-6, TNF- α , PGE₂ e LTB₄. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 (WT) ou de camundongos TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e CD14^{-/-} foram estimulados com TsV (50 μ g/ml) (A, B) por 30 min ou 24 h (E, F); ou com Ts1 (50 μ g/ml) (C, D, G e H) por 24 h, a 37 °C, 5% CO₂. A concentração de IL-6 (A, C), TNF- α (B, D), PGE₂ (E, G) e LTB₄ (F, H) no sobrenadante de cultura foi determinada por ELISA. Resultados expressos como média $\pm$ SEM (n = 12) de três experimentos diferentes. *p < 0,05 comparado com C57Bl/6, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.3.3. Ativação da via de sinalização celular após o reconhecimento por TsV

As vias das MAPKs p38, ERK1/2 e JNK1/2 são ativadas pelos TLRs específicos (HU et al., 2007) ou ligantes (MACKICHAN & DEFRANCO, 1999), e induzem a expressão de genes de citocinas inflamatórias e mediadores lipídicos (LIN et al., 2013). Para identificar a via de sinalização envolvida na ativação celular induzida por TsV, nós incubamos os macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57BL/6 com TsV (50 µg/mL) por diferentes períodos. O tratamento das células com TsV resultou na fosforilação de p38 e ERK1/2, mas não alterou o estado de fosforilação de JNK1/2 (Fig. 20).

Já é conhecido que após a ligação dos estímulos em TLRs, há a ativação de NF-κB para que ocorra a produção de mediadores inflamatórios em monócitos e macrófagos (KARIN & BEN-NERIAH, 2000). Assim, nós analisamos as proteínas envolvidas nas vias de sinalização ativadas por TsV que induzem a produção de IL-6, TNF-α, PGE₂ e LTB₄. Observamos que a estimulação de macrófagos de animais da linhagem C57BL/6 com TsV (50 µg/mL), resultou no aumento da fosforilação de IκB-α (Fig. 21A), NF-κB (Fig. 21B) e de c-Jun (fator de transcrição da via das MAPKs) (Fig. 21C). Estes dados indicam que o TsV induz a fosforilação de proteínas que estão envolvidas na ativação das vias pró-inflamatórias MAPKs e NF-κB.

Figura 20: p38 e ERK1/2 estão envolvidas na ativação de macrófagos induzida por TsV. A expressão de p38 (A), ERK1/2 (B) e JNK1/2 (C) foram determinadas por *CBA flex* em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57Bl/6 e estimuladas com TsV (50 µg/ml) por 10, 30, 60 ou 120 min. Células não estimuladas foram usadas como controle (RPMI). Os dados estão expressos como a quantidade relativa da proteína pelo controle do experimento. * $p < 0,05$ comparado com o meio (linha tracejada), utilizando o teste one-way ANOVA. Resultados expressos como média $\pm$ SEM ($n = 6$), de dois experimentos independentes.

Figura 21: TsV induz a fosforilação de NF- κ B, $\text{IkB}\alpha$ e c-Jun em macrófagos. Macrófagos peritoneais obtidos de camundongos C57Bl/6 foram estimulados com TsV (50 $\mu\text{g/mL}$) por 10 min, 2 e 24 h a 37 °C, 5% CO_2 . Células não estimuladas foram usadas como controle (RPMI). A quantidade de proteína fosforilada p- $\text{IkB}\alpha$ (A), p-NF- κ B (B) e p-c-Jun (C) foi determinada usando o kit *PathScan* como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos como a porcentagem da quantidade relativa de proteína e normalizados pelo controle positivo (100%) do kit (linha tracejada). * $p < 0,05$ comparado com RPMI, utilizando o teste one-way ANOVA. Os valores estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 4$) de dois experimentos independentes.

Nosso próximo objetivo foi determinar se a ativação das vias inflamatórias de NF- κ B e c-Jun induzida por TsV era dependente de TLR2, TLR4 ou da molécula adaptadora MyD88. TsV induziu a fosforilação de NF- κ B e I κ B α em macrófagos peritoneais de animais da linhagem C57BL/6. No entanto, a quantidade de NF- κ B (Fig. 22A) e I κ B α (Fig. 22B) fosforilada em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos deficientes de TLR2 e TLR4 foram menores do que quando observada em macrófagos de animais da linhagem C57BL/6. Entretanto, o aumento da fosforilação de c-Jun inicial foi observada em macrófagos peritoneais obtidos de TLR2^{-/-} estimulados com TsV, mas o mesmo não ocorreu com células de camundongos TLR4^{-/-} (Fig. 22C). Estes resultados demonstraram que a ativação de NF- κ B induzida por TsV requer TLR2/TLR4, ao passo que a fosforilação de c-Jun é dependente apenas de TLR4.

A molécula adaptadora MyD88 forma complexos com múltiplas moléculas, incluindo IRF5, IRAK4, TRAF6, para ativar NF- κ B e MAPKs (HARDIMAN et al., 1996; TAKEDA & AKIRA, 2004; AKIRA, 2006). Neste estudo, nós investigamos se a molécula adaptadora MyD88 estaria envolvida na sinalização induzida por TsV. A fosforilação de NF- κ B (Fig. 22D) e I κ B α (Fig. 22E) em macrófagos peritoneais de camundongos MyD88^{-/-} foi menor do que a fosforilação dos macrófagos da linhagem C57BL/6, após 10 e 120 minutos de estimulação. Porém, observamos que a fosforilação de c-Jun foi aumentada após 10 minutos de estimulação com TsV nas células deficientes de MyD88, mas que não houve alteração aos 120 min (Fig. 22F). Para confirmar nossos resultados, utilizamos outro método para demonstrar a participação dos receptores TLR4 e TLR2 na ativação de NF- κ B. Utilizamos um antagonista para TLR4 e um bloqueador para o receptor TLR2, respectivamente, LPS-RS e TLR2 anti-mTLR2-IgG. Para isso, usamos uma linhagem de células RAW-Blue, a qual secreta um gene repórter, SEAP, que é integrado no DNA celular e induzido pela ativação do NF- κ B. Observamos que o LPS-RS e anti-mTLR2-IgG inibiu a secreção de SEAP em comparação com as células tratadas apenas com TsV ou Ts1 (Fig. 23). LPS, um agonista de TLR4 que ativa a via NF- κ B, foi usado como controle positivo.

Figura 22: TsV induz ativação de NF-κB dependente de TLR2- e TLR4- / MyD88, e de AP-1, dependente de TLR4. Macrófagos peritoneais C57Bl/6 (WT), TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} foram estimulados com TsV (50 µg/ml) por 10 ou 120 min a 37 °C, 5% CO₂. A quantidade de proteína fosforilada p-NF-κB (A, D), p-IκBα (B, E) e p-c-Jun (C, F) foi determinada usando o *kit PathScan* como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados estão expressos como a porcentagem da quantidade relativa de proteína e normalizados pelo controle positivo do kit (100%) (linha tracejada). * $p < 0,05$ comparado com C57Bl/6, utilizando o teste one-way ANOVA. Os valores estão expressos como média ± SEM (n = 4) de dois experimentos independentes.

Figura 23: Ativação de NF-κB por TsV e Ts1 em células RAW-Blue™ é dependente de TLR2 e TLR4. Estas células são derivadas de macrófagos RAW 264.7 e contém um gene repórter constitutivo induzido pelo NF-κB e integrado no DNA. As células RAW-Blue foram pré-incubadas com (A) anti-mTLR2-IgG (100 ng/ml) ou (B) LPS-RS (10 ng/ml) por 30 min. Após este período, LPS (0,5 µg/ml) ou 50 µg/ml de TsV ou Ts1 foram adicionados à cultura, por 24 h. O substrato QUANTI-Blue™ foi usado para medir a secreção da fosfatase alcalina embrionária (SEAP) em 650 nm com o leitor de ELISA. * $p < 0,05$ comparado com as células não estimuladas (linha tracejada), utilizando o teste one-way ANOVA. Os valores estão expressos como média ± SEM (n = 12) de três experimentos independentes.

4.3.4. Os receptores envolvidos na sinalização intracelular induzida por Ts1 são semelhantes aos receptores ativados por TsV

Nosso próximo passo foi determinar se a sinalização intracelular induzida por Ts1 seria semelhante à do TsV. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} foram estimulados *in vitro* com Ts1 (50 µg/mL) durante 10 ou 120 min. Nós observamos aumento de p-NF-κB (Fig. 24A), p-IκBα (Fig. 24B) e p-c-Jun (Fig. 24C) em macrófagos peritoneais de C57Bl/6 e diminuição da fosforilação de NF-κB e IκBα nos macrófagos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} (Figs. 24A e 24B, respectivamente). Similar ao que foi observado com TsV, nós também detectamos aumento da fosforilação de c-Jun em macrófagos TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} estimulados com Ts1 quando comparado com os macrófagos dos animais da linhagem C57Bl/6 (Fig. 24C). Em macrófagos peritoneais MyD88^{-/-} que foram estimulados com Ts1 (50 µg/mL) durante 10 minutos ocorreu diminuição da fosforilação de NF-κB (Fig. 24D) e IκBα (Fig. 24E) quando comparados com os macrófagos estimulados da linhagem C57Bl/6. No entanto, a fosforilação de c-Jun nos macrófagos WT e nos deficientes de MyD88 foi semelhante (Fig. 24F). Em conjunto, os nossos dados indicam que TsV e Ts1 são agonistas de TLR2, TLR4 ou CD14, e que desencadeiam as vias de sinalização

---

intracelular, resultando na fosforilação de NF- κ B dependente de MyD88 e ativação de c-Jun independente de MyD88.

Figura 24: Ts1 induz ativação de NF- κ B dependente de TLR2- e TLR4- / MyD88, e ativação de AP-1, independente de TLR2- e TLR4- / MyD88. Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 (WT), TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} foram estimulados com Ts1 (50 μ g/ml) por 10 ou 120 min a 37 °C, 5% CO₂. A quantidade de proteína fosforilada p-NF- κ B (A, D), p-I κ B α (B, E) e p-c-Jun (C, F) foi determinada usando o *kit PathScan* como descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expressos como a porcentagem da quantidade relativa de proteína e normalizados pelo controle positivo do kit (100%) (linha tracejada). * $p < 0,05$ comparado com C57Bl/6, utilizando o teste one-way ANOVA. Os valores estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 4) de dois experimentos independentes.

Discussão

Danos celulares são fundamentais para o início da resposta imune inata e à preservação da integridade do hospedeiro. As células responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs e DAMPs expressam PRRs, levando à liberação de mediadores inflamatórios (KUMAR et al., 2011; KOLLI et al., 2013). No entanto, estudos sobre o reconhecimento de peçonha de escorpião e de suas toxinas e sua influência na resposta imune inata após o envenenamento são escassos. Nesta etapa, identificamos TLR2, TLR4 e CD14 como os receptores que detectam TsV e seu principal componente, a toxina Ts1. Também demonstramos que o reconhecimento de TsV e Ts1 por PRRs são dependentes da estrutura terciária de TsV e Ts1 e independentes de agentes patogênicos ou danos celulares-derivado de produtos. Por isso, propusemos o termo VAMP (Padrões Moleculares Associados a Venenos) para referir-se às moléculas que são injetadas no hospedeiro por picadas e reconhecidas por PRRs, resultando em inflamação. Além disso, demonstramos que após o reconhecimento de TsV e Ts1 por PRRs, ocorre a sinalização por via dependente ou independente de MyD88, responsáveis pela ativação de NF- κ B e AP-1 e pela liberação de TNF- α , IL-6, PGE₂ e LTB₄.

Os macrófagos desempenham um papel-chave na inflamação (MURRAY & WYNN, 2011). Estas células expressam PRRs que reconhecem DAMPs e PAMPs e liberam citocinas e mediadores lipídicos (MURRAY & WYNN, 2011; YANG et al., 2013). No presente estudo, foi demonstrado que TsV e Ts1 interagiram com PRRs presentes em macrófagos murinos, estimulando a produção de citocinas inflamatórias e mediadores lipídicos, independente de morte celular. Nós também demonstramos, pela primeira vez, que TsV e Ts1 induziram a liberação de TNF- α e IL-6 através do reconhecimento por TLR2, TLR4 e CD14. Os dados da literatura demonstraram que o TLR2 e TLR4 podem funcionar como receptores de LPS, e que a co-expressão de membrana do CD14 com TLR4 pode preferencialmente melhorar a capacidade de TLR4 na resposta ao LPS. Uma explicação adicional para estas diferenças pode ser a recente descoberta de que a proteína adicional, DM-2, é necessária para conferir a capacidade de resposta ao LPS em células que expressam TLR4 (SHIMAZU et al., 1999). Além disso, o TLR2 reconhece componentes bacterianos, tais como peptidoglicano (PGN), lipoproteína bacteriana (Pam3CSK4), lipoproteína de micoplasma (Malp2), lipoarabinomanana (LAM), e âncoras de glicosilfosfadilinositol

(GPI) derivados de protozoário parasitas (MEANS et al., 1999; TAKEUCHI et al., 1999; CAMPOS et al., 2001). Por conseguinte, nossos resultados sugeriram que o TLR2 e TLR4 são importantes para iniciar a inflamação que ocorre durante o envenenamento, e CD14 ajuda a melhorar a capacidade de resposta. No entanto, os detalhes da via de ativação celular subsequente ainda requerem elucidação.

Os nossos resultados também demonstraram que a produção de PGE_2 através da estimulação com TsV ou Ts1 foi dependente de TLR4 e CD14, mas independente de TLR2, semelhante ao que foi reportado para os macrófagos estimulados com LPS (WEINLICH et al., 2008). No entanto, a produção de LTB_4 após a estimulação com TsV foi dependente de TLR2 e TLR4, mas independente de CD14. Em conjunto, os resultados sugerem que na ausência de TLR2, a ativação de COX-2 está aumentada e que CD14 regula a produção de LTB_4 negativamente. A natureza da ligação entre a peçonha e CD14 ou qualquer outro receptor ainda não é conhecido e deve ser investigado.

Outro objetivo desta etapa foi identificar a via de sinalização desencadeada por TsV após reconhecimento por TLR2, TLR4 e CD14. A ativação de NF- κ B é essencial para a coordenação das respostas imune inata e adaptativa, incluindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (LI & VERMA, 2002; MANCUSO et al., 2002). Os dados do presente estudo indicaram que TsV e Ts1 induziram a fosforilação das proteínas NF- κ B e I κ B α . Estes resultados foram consistentes com um estudo anterior, o qual demonstrou que após a estimulação de LPS, a proteína I κ B foi fosforilada e degradada, permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo, ativando a transcrição de genes alvos (GUHA & MACKMAN, 2001). Além disso, demonstramos que a ativação de MAPKs (ERK1/2 e p38) em macrófagos estimulados com TsV contribuiu para a produção de citocinas inflamatórias. Estudos anteriores demonstraram que o veneno de abelha e o seu principal componente, melitina, suprimiram a ativação de NF- κ B induzida por LPS por bloquear a degradação de I κ B α e a fosforilação de JNK (MOON et al., 2007). A ativação de NF- κ B também pode ser regulada por quinases celulares, tais como as MAPKs (GUHA & MACKMAN, 2001), assim, a possibilidade de interferência entre estas vias durante a produção de citocinas inflamatórias induzida por TsV não pode ser excluída.

Posteriormente, nós determinamos se a ativação de NF- κ B e AP-1 mediada por TsV ocorre após o reconhecimento de TLR2 ou TLR4 e se a molécula adaptadora MyD88 desempenha papel neste processo. TLR2 freqüentemente forma

heterodímeros com TLR1 ou TLR6 para responder a diferentes ligantes (TAKEDA et al., 2004; TAKEDA & AKIRA, 2004; O'NEILL et al., 2013). TLR2 coopera com TLR6 em resposta a Malp2 (GIRARD et al., 2003) e se associa com TLR1 para reconhecer Pam3CSK4 (OZINSKY et al., 2000). Está bem estabelecido que os TLRs podem reconhecer agentes infecciosos através dos PAMPs e desencadear respostas imunes antimicrobianas no hospedeiro (AKIRA, 2006). No entanto, novas evidências indicam que certas moléculas podem também ativar TLRs, como TLR2-MyD88, independente da ativação de TLR1 e TLR6 (YANG et al., 2008). Nós observamos que a ativação de NF- κ B ocorreu de modo dependente de MyD88 como resultado da ativação de TLR2 e TLR4, sugerindo que estes receptores são importantes na resposta ao TsV. Entretanto, a ativação da via AP-1 foi dependente de TLR4, mas pode ser dependente ou independente de TLR2 e MyD88 (CHEN et al., 2004; BURNS et al., 2010). Normalmente, TLR4 sinaliza através da molécula adaptadora, MyD88, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (HORNG & MEDZHITOV, 2001; KAISHO et al., 2001; AKIRA, 2006; O'NEILL et al., 2013). O envolvimento de TRIF em eventos pró-inflamatórios tem sido reportado (YAMAMOTO et al., 2003; KRUMMEN et al., 2010), e o seu papel na sinalização mediada por TsV não pode ser descartado.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar que TsV e Ts1 podem induzir a produção de mediadores inflamatórios, interagindo com TLR2 e CD14/TLR4. Demonstramos ainda que a fosforilação de NF- κ B é dependente de TLR2- e TLR4/MyD88 e é provavelmente mediada por Ts1, o componente majoritário de TsV. Em contraste, a fosforilação de c-Jun é independente de TLR2/MyD88 e isto pode ser resultado de outros componentes do TsV. Embora, nós observamos aumento da fosforilação de c-Jun em macrófagos deficientes para TLR2 e TLR4 após estimulação com Ts1, os nossos resultados indicam que o reconhecimento de peçonha ocorre através de TLR2 e TLR4, resultando na ativação de NF- κ B para gerar a produção de IL-6 e TNF- α . Nossos resultados não excluem a possibilidade de que a ativação de c-Jun pode ser devido a outro receptor de membrana, o que merece uma investigação mais aprofundada.

Estes resultados indicam que TsV sinaliza através de TLR2 e TLR4/CD14, ativando as vias de sinalização de NF- κ B e MAPKs, que pode servir como alvos terapêuticos importantes para a prevenção dos efeitos deletérios que resultam da liberação intensa de mediadores inflamatórios sistêmico após o envenenamento com *T. serrulatus*. Como alternativa, apesar de uma série de tratamentos com anti-

venenos, que normalmente tentam neutralizar a peçonha nociva, nossos resultados sugerem que antagonistas para TLRs podem ter potencial terapêutico benéfico após o envenenamento.

E, por fim, fomos investigar a formação de CLs induzidos pelo TsV, uma vez que os CLs são organelas dinâmicas com papel-chave na síntese de mediadores lipídicos (BOZZA et al., 2007).

PARTE 4: Estudo da sinalização de CLs em macrófagos estimulados com TsV, bem como a produção de mediadores lipídicos.**Para tanto avaliamos:**

- A formação de CLs;
- A participação de mediadores secundários (PGE₂ e LTB₄) na formação de CLs;
- A expressão de PPAR γ ;
- O papel de PPAR γ na formação de CLs e na produção de mediadores inflamatórios.

4.4.1. TsV induz formação de CLs e produção de LTB₄ e PGE₂ em macrófagos estimulados

Com base nos nossos resultados anteriores que 50 μ g/mL de TsV não afetou a viabilidade dos macrófagos peritoneais, usamos esta concentração para os experimentos seguintes. Primeiro, avaliamos a capacidade de TsV em induzir a formação de CLs em macrófagos peritoneais. Como mostrado na figura 25A após 30 min, 4 e 24 horas, o TsV induziu aumento na formação de CLs em macrófagos peritoneais quando comparado à células não estimuladas (controle). Sabe-se que os CLs são organelas especializadas envolvidas na compartimentalização e amplificação da síntese de eicosanóides (BOZZA & VIOLA, 2010). Assim, nós investigamos se o aumento do número de CLs em macrófagos estimulados com TsV poderia aumentar a produção de PGE₂ e LTB₄. O aumento no número de CLs em macrófagos estimulados com TsV (50 μ g/mL) após 30 min, 4 e 24 h se correlacionou com o aumento na produção de LTB₄ e PGE₂ liberados pelas células após estimulação com o ionóforo de cálcio A23187 (Figs. 25B e 25C, respectivamente). Estes resultados sugerem que durante o envenenamento, os CLs são importantes sítios de geração de eicosanóides.

Figura 25. TsV induz formação de CLs e produção de PGE₂ e LTB₄. Macrófagos aderentes de animais C57Bl/6 foram estimulados com TsV (50 µg/mL) por 30 min, 4 e 24 h, a 37 °C, 5% CO₂. Células não estimuladas foram usadas como controle. Após os diferentes períodos, as células foram coradas com tetróxido de ósmio e os CLs foram contados em microscópio óptico de campo claro (A) ou as células foram estimuladas por 15 min com ionóforo de cálcio A23187 (0,5 µM) para quantificação de LTB₄ (B) e PGE₂ (C) por ELISA. * $p < 0,05$ comparada com o controle, utilizando o teste one-way ANOVA. Os valores estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$) de 2 experimentos independentes.

4.4.2. TsV induz formação de CLs através de TLR2, TLR4 e PPAR γ

O nosso grupo demonstrou que β -glucana da parede celular do *H. capsulatum* induz formação de CLs através de TLR2 (SORGI et al., 2009). Os nossos resultados da Parte 3 demonstraram que TsV regulou a expressão do gene *Tlr2*, e que a produção de PGE₂ e LTB₄ foi parcialmente dependente de TLR2 e TLR4. Para confirmar a participação de TLR2 e TLR4 na formação CLs, macrófagos aderentes de camundongos C57Bl/6, TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} foram estimulados com TsV (50 µg/mL) durante 30 min, 4 e 24 h. Comparado com os macrófagos de animais C57Bl/6, nós observamos diminuição na formação de CLs quando macrófagos provenientes de TLR2^{-/-} foram estimulados com TsV por todo período estudado (Fig. 26A). Enquanto

que os macrófagos de animais TLR4^{-/-} diminuíram a formação de CLs após 30 min e 4 h de estímulo com TsV (Fig. 26A). Além disso, recentemente, dados da literatura demonstraram que a formação de CLs, pela infecção por BCG derivado de *M. bovis*, é via dependente TLR2 e PPAR- γ (ALMEIDA et al., 2014). Então, nosso próximo passo foi avaliar a expressão gênica do receptor endógeno *Pparg*. Para este experimento, os macrófagos peritoneais da linhagem C57Bl/6 foram cultivados com ou sem TsV por 30 min, 4 e 24 h. A análise da expressão gênica revelou que a estimulação por TsV promove a expressão de *Pparg* após 4 e 24 h de estímulo (Figura 26B). E, para investigar a participação deste fator de transcrição na sinalização de CLs induzida por TsV, as células aderentes foram pré-tratadas com antagonista de PPAR γ (GW9662) por 30 min e estimuladas com TsV (50 μ g/mL) por 4 e 24 h. Nós observamos que após o pré-tratamento dos macrófagos com GW, a formação de CLs foi menor do que a dos macrófagos apenas estimulados com TsV (Fig. 26C). Em conjunto, esses resultados indicaram que TLR2, TLR4 e PPAR γ regularam a formação de CLs em macrófagos estimulados com TsV.

Figura 26. TsV aumenta a expressão de *Pparg*, e a formação de CLs é dependente de TLR4, TLR2 e PPAR γ em macrófagos estimulados. (A) Macrófagos peritoneais de animais C57Bl/6 (WT), TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} foram estimulados com TsV (50 μ g/ml) por 30 min, 4 e 24 h, a 5% CO₂, 37 °C. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e contados. Os valores estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 6) de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com meio. (B) Macrófagos de animais C57Bl/6 foram estimulados com TsV (50 μ g/mL) por 30 min, 4 e 24 h. Células não-estimuladas foram usadas como controle. As células foram lisadas e o RNA total foi extraído. qRT-PCR foi usada para determinar a expressão relativa de *Pparg*. Os resultados foram normalizados pela expressão de genes de referência *Actb* e *Gapdh*. O método $\Delta\Delta$ Ct foi usado para analisar os dados de qRT-PCR. Os resultados estão apresentados como quantidade relativa dos genes de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o meio. (C) Macrófagos aderentes de animais C57Bl/6 (WT) foram pré-tratados ou não com GW9662 por 30 min. Após, as células foram estimuladas com (50 μ g/ml) por 4 e 24 h, a 5% CO₂, 37 °C. Células não estimuladas foram usadas como controle. Os CLs foram corados com tetróxido de ósmio e contados. Os valores estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 6) de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com meio, utilizando o teste one-way ANOVA.

4.4.3. A produção de LTB₄ e PGE₂ é dependente de PPAR γ em macrófagos estimulados com TsV

Visto que a formação de CLs é regulada por PPAR γ , nosso último experimento foi investigar o papel de PPAR γ na produção de mediadores lipídicos. A produção de LTB₄ e PGE₂ após estimulação com ionóforo de cálcio A23187, induzida por TsV, foi menor quando os macrófagos foram pré-tratados com o inibidor de PPAR γ (Figs. 27A e 27B, respectivamente). Por outro lado, a produção de mediadores inflamatórios protéicos, como IL-6, IL-1 β e KC, induzida pelo TsV, não foi dependente de PPAR γ (Figs. 27C, 27D e 27E, respectivamente). Estes resultados em conjunto, mostraram que a sinalização por PPAR γ após reconhecimento do TsV induziu a formação de CLs e a produção de PGE₂ e LTB₄.

Figura 27. A produção de LTB₄ e PGE₂ é dependente da sinalização por PPAR γ . Macrófagos aderentes de animais C57Bl/6 (WT) foram pré-tratados ou não com GW9662 por 30 min antes da estimulação das células com TsV (50 µg/ml) por 4 e 24 h, a 5% CO₂, 37 °C. As células não estimuladas foram usadas como controle. Após estes períodos, as células foram estimuladas por 15 min com ionóforo de cálcio A23187 (0,5 µM) para quantificação de LTB₄ (A) e PGE₂ (B) por ELISA. Células aderentes também foram estimuladas com TsV por 24 h, e a produção de IL-6 (C), IL-1 β (D) e KC (E) foi quantificada. * $p < 0,05$ comparada com o controle, utilizando o teste one-way ANOVA.

Discussão

Na seção de resultados da parte 2 e 3, nós demonstramos, que o LTB₄ e PGE₂ são mediadores inflamatórios importantes produzidos na cavidade peritoneal de camundongos após a injeção i.p. de Ts2 ou Ts6, e que também são produzidos por macrófagos estimulados, *in vitro*, com TsV. Na literatura, está bem estabelecido o papel dos CLs na síntese de eicosanóides (MELO et al., 2011), e recentemente, foi demonstrado o papel de PPAR γ na regulação de metabolismo lipídico, na formação de CLs e na resposta imune por infecção de *Mycobacterium* (ALMEIDA et al., 2009; RAJARAM et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012; DE MATTOS et al., 2012; MAHAJAN et al., 2012). Entretanto, o mecanismo de formação de CLs e o papel destas organelas como fonte produtora de mediadores lipídicos pelo TsV, não foi mencionado até o momento. Nosso estudo revelou que a formação de CLs induzida por TsV foi importante para a produção de LTB₄ e PGE₂ após estimulação com ionóforo de cálcio. Também demonstramos que ocorreu ativação de PPAR γ após reconhecimento do TsV por TLR2 e TLR4, e que esta ativação foi importante para a formação CLs, assim como para a geração de PGE₂ e LTB₄.

O papel dos macrófagos, como elementos-chave na resposta inata tem sido extensivamente revisado (MURRAY & WYNN, 2011), e os CLs formados nestas células têm sido associados como regulador da síntese de mediadores em doenças inflamatórias e infecciosas (ALMEIDA et al., 2009; SORGI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2014). Nosso grupo demonstrou que o TLR2 está associado com a formação de CLs induzida por *H. capsulatum* (SORGI et al., 2009). Além disso, a formação de CLs, em macrófagos estimulados com LPS, ocorreu através de mecanismo dependente de TLR4 (PACHECO et al., 2002). Nós demonstramos que os mediadores inflamatórios são liberados como resultado do reconhecimento de VAMP por PRRs. Assim, investigamos o papel de PRRs na formação de CLs induzida pelo TsV. Nós observamos diminuição na formação de CLs em macrófagos deficientes para TLR4 e TLR2, indicando importante papel destes receptores na via de síntese de CLs. Assim, pode-se especular que a formação de CLs induzida por TsV ocorreu através de dois mecanismos diferentes, (1) interação direta entre a peçonha e os receptores de células, ou (2) mecanismos indiretos mediados por produção de citocinas e quimiocinas pelas células estimuladas com TsV. Notavelmente, os CLs podem funcionar não apenas como locais para síntese de mediadores lipídicos, mas também como organelas envolvidas na sinalização celular

(FUJIMOTO et al., 2004; LIU et al., 2004; WAN et al., 2007). Os CLs compartimentalizam proteínas envolvidas em diferentes classes, tais como, caveolina e as proteínas da família Rab (LIU et al., 2004; POL et al., 2004; MARTIN et al., 2005; WAN et al., 2007), proteínas kinases como a PI3K, MAPK e PKC (YU et al., 1998; YU et al., 2000; CHEN et al., 2002).

Dados da literatura demonstraram que a formação de CLs são controlados por diferentes mecanismos. Ginnotti et al. (2013), demonstraram que a enzima Lys49 da fosfolipase A₂, isolada da peçonha da serpente *Bothrops asper*, induziu a formação de CLs por vias que incluem PKC, PI3K, ERK1/2 e iPLA₂, e nós também demonstramos que TsV ativou proteínas intracelulares como, ERK1/2 e p38 MAPKs e NF-κB para induzir a liberação de mediadores inflamatórios. Além da ativação de NF-κB pela via das MAPKs, a expressão de PPARγ é também dependente de sinalização específica. PPARγ pode funcionar como regulador chave da transcrição de diferenciação celular, inflamação e metabolismo lipídico em macrófagos e células dendríticas (SZATMARI & NAGY, 2008). Está bem estabelecido que o PPARγ é ativado em células enriquecidas com CLs, e que pode modular os processos associados com a formação de CLs em leucócitos durante a infecção por micobactéria intracelular (ALMEIDA et al., 2009). Os dados do presente estudo indicaram que os macrófagos pré-tratados com antagonista de PPARγ e estimulados com TsV inibiram a formação de CLs e a produção de PGE₂ e LTB₄. Estes resultados foram consistentes com um estudo anterior que demonstrou diminuição de CLs em macrófagos infectados *in vitro* com BCG derivado de *M. bovis*, após adição do antagonista de PPARγ (ALMEIDA et al., 2014). No entanto, os detalhes subseqüentes da ativação celular pelo TsV e a interação com PPARγ, ainda requerem mais estudos.

De acordo com nossos dados, nós demonstramos que o reconhecimento de TsV por macrófagos via TLR4/TLR2 resulta na ativação de PPARγ e NF-κB. A ativação de PPARγ por TsV induz a formação de CLs e produção de PGE₂ e LTB₄. Entretanto, em outros modelos, a formação de CLs é dependente de PPARγ, mas independente de NF-κB. Os autores demonstraram ainda que a ativação de PPARγ pode modular negativamente a atividade de NF-κB, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Almeida et al., 2012). Em conclusão, estes resultados indicam que PPARγ pode ser um candidato alvo atraente para as estratégias de intervenção terapêutica, diminuindo as lesões causadas por *T. serrulatus*.

*“Não vim até aqui/ Pra desistir agora
Entendo você/ Se você quiser ir embora
Não vai ser a primeira vez
Nas últimas 24 horas
Mas eu não vim até aqui
Pra desistir agora
Minhas raízes estão no ar
Minha casa é qualquer lugar
Se depender de mim
Eu vou até o fim .....”
(Engenheiros do Hawaii)*

5. CONCLUSÕES

-
- ✓ TsV, e suas toxinas Ts1 e Ts6 induzem a produção de NO, IL-6 e TNF- α por células J774.1, e estes mediadores podem ser potencializados pela presença de LPS;
  - ✓ Ts2 apresenta atividade anti-inflamatória, *in vitro*, pois induz a produção de IL-10 e inibiu a liberação de NO, IL-6 e TNF- α , induzida pelo LPS;
  - ✓ *In vivo*, Ts2 e Ts6 induziram leucocitose com predominância de neutrófilos na cavidade peritoneal, bem como aumento de proteína total, LTB₄, PGE₂ e citocinas pro-inflamatórias;
  - ✓ O recrutamento celular induzido por Ts2 ou Ts6 é parcialmente dependente de PGs e LTs;
  - ✓ Ts2 tem papel regulador na resposta inflamatória, uma vez que estimulou a produção de IL-10 pelas células recrutadas para a cavidade peritoneal;
  - ✓ TsV e Ts1 são reconhecidos por TLR2, TLR4 e CD14 para produção de citocinas e mediadores lipídicos;
  - ✓ TsV induz a ativação de NF- κ B dependente de TLR2- e TLR4-/MyD88, e de c-Jun dependente de TLR4 e independente de TLR4/MyD88;
  - ✓ Criamos o termo VAMP para referir aos padrões moleculares associados à veneno e que são reconhecidos por PRRs;
  - ✓ TsV induz a ativação de PPAR γ via TLR4/TLR2;
  - ✓ A ativação de PPAR γ por TsV induz a formação de CLs e produção de PGE₂ e LTB₄.

Figura 28. Figura esquemática demonstrando o mecanismo de ação do TsV em macrófagos. O reconhecimento do TsV por TLR4/TLR2 resulta na ativação de (1) PPAR γ , que induz a formação de CLs, produção de mediadores lipídicos e também pode modular a produção de citocinas inflamatórias, e de (2) NF- κ B, que leva a produção de citocinas inflamatórias. Além disso, a sinalização pelo TsV pode ocorrer (a) dependente de MyD88 via reconhecimento por TLR4/TLR2, resultando na translocação do NF- κ B ou (b) independente de MyD88 via reconhecimento por TLR4, resultando na ativação das MAPKs (ERK1/2 e p38) e expressão de c-Fos e Jun.

*“Valeu a pena, é é
Valeu a pena, é é
Sou pescador de ilusões
Sou pescador de ilusões...”*
(O Rappa)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S. TLR signaling. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.311, p. 1-16, 2006.
- AKIRA, S.; MISAWA, T.; SATOH, T.; SAITOH, T. Macrophages control innate inflammation. **Diabetes Obes Metab**, v.15 Suppl 3, p. 10-18, 2013.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**, v.75(6), p. 639-653, 2004.
- ALMEIDA, P.E.; CARNEIRO, A.B.; SILVA, A.R.; BOZZA, P.T. PPARgamma Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. **PPAR Res**, v.2012, p. 383829, 2012.
- ALMEIDA, P.E.; ROQUE, N.R.; MAGALHAES, K.G.; MATTOS, K.A.; TEIXEIRA, L.; MAYA-MONTEIRO, C.; ALMEIDA, C.J.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V.F.; BOZZA, P.T. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection. **Biochim Biophys Acta**, v.1841(1), p. 97-107, 2014.
- ALMEIDA, P.E.; SILVA, A.R.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; TOROCSI, D.; D'AVILA, H.; DEZSO, B.; MAGALHAES, K.G.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; NAGY, L.; BOZZA, P.T. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **J Immunol**, v.183(2), p. 1337-1345, 2009.
- ANDERSSON, L.; BOSTROM, P.; ERICSON, J.; RUTBERG, M.; MAGNUSSON, B.; MARCHESAN, D.; RUIZ, M.; ASP, L.; HUANG, P.; FROHMAN, M.A.; BOREN, J.; OLOFSSON, S.O. PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. **J Cell Sci**, v.119(Pt 11), p. 2246-2257, 2006.
- ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R. A simplified procedure for the fractionation of Tityus serrulatus venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v.27(8), p. 907-916, 1989.
- BAGGA, D.; WANG, L.; FARIAS-EISNER, R.; GLASPY, J.A.; REDDY, S.T. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100(4), p. 1751-1756, 2003.
- BANDEIRA-MELO, C.; PHOOFULO, M.; WELLER, P.F. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. **J Biol Chem**, v.276(25), p. 22779-22787, 2001.
- BANDEIRA-MELO, C.; WOODS, L.J.; PHOOFULO, M.; WELLER, P.F. Intracrine cysteinyl leukotriene receptor-mediated signaling of eosinophil vesicular transport-mediated interleukin-4 secretion. **J Exp Med**, v.196(6), p. 841-850, 2002.
- BAZZONI, F.; TAMASSIA, N.; ROSSATO, M.; CASSATELLA, M.A. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. **Eur J Immunol**, v.40(9), p. 2360-2368, 2010.
- BECERRIL, B.; MARANGONI, S.; POSSANI, L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus Tityus. **Toxicon**, v.35(6), p. 821-835, 1997.
- BOWIE, A.O.; NEILL, L.A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. **Biochem Pharmacol**, v.59(1), p. 13-23, 2000.
- BOZZA, P.T.; BAKKER-ABREU, I.; NAVARRO-XAVIER, R.A.; BANDEIRA-MELO, C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.85(5), p. 205-213, 2011.
- BOZZA, P.T.; MELO, R.C.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacol Ther**, v.113(1), p. 30-49, 2007.
- BOZZA, P.T.; PAYNE, J.L.; GOULET, J.L.; WELLER, P.F. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. **J Exp Med**, v.183(4), p. 1515-1525, 1996.
- BOZZA, P.T.; VIOLA, J.P. Lipid droplets in inflammation and cancer. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.82(4-6), p. 243-250, 2010.

- BOZZA, P.T.; YU, W.; PENROSE, J.F.; MORGAN, E.S.; DVORAK, A.M.WELLER, P.F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **J Exp Med**, v.186(6), p. 909-920, 1997.
- BOZZA, P.T.; YU, W.WELLER, P.F. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.92 Suppl 2, p. 135-140, 1997.
- BURNS, E.; ELIYAHU, T.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.NUSSBAUM, G. TLR2-dependent inflammatory response to *Porphyromonas gingivalis* is MyD88 independent, whereas MyD88 is required to clear infection. **J Immunol**, v.184(3), p. 1455-1462, 2010.
- CAMPOS, M.A.; ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E.P.; PROCOPIO, D.O.; TRAVASSOS, L.R.; SMITH, J.A.; GOLENBOCK, D.T.GAZZINELLI, R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, v.167(1), p. 416-423, 2001.
- CARBONE, E.; WANKE, E.; PRESTIPINO, G.; POSSANI, L.D.MAELICKE, A. Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. **Nature**, v.296(5852), p. 90-91, 1982.
- CATTERALL, W.A. Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.20, p. 15-43, 1980.
- CESTELE, S.CATTERALL, W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v.82(9-10), p. 883-892, 2000.
- CHAUDRY, I.H. ATP-MgCl₂ and liver blood flow following shock and ischemia. **Prog Clin Biol Res**, v.299, p. 19-31, 1989.
- CHAWLA, A.; BARAK, Y.; NAGY, L.; LIAO, D.; TONTONNOZ, P.EVANS, R.M. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nat Med**, v.7(1), p. 48-52, 2001.
- CHEN, G.Y.NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v.10(12), p. 826-837, 2010.
- CHEN, J.S.; GREENBERG, A.S.WANG, S.M. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. **J Cell Biochem**, v.86(4), p. 784-791, 2002.
- CHEN, R.; LIM, J.H.; JONO, H.; GU, X.X.; KIM, Y.S.; BASBAUM, C.B.; MURPHY, T.F.LI, J.D. Nontypeable *Haemophilus influenzae* lipoprotein P6 induces MUC5AC mucin transcription via TLR2-TAK1-dependent p38 MAPK-AP1 and IKKbeta-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v.324(3), p. 1087-1094, 2004.
- COFFEY, M.J.; PHARE, S.M.; LUO, M.PETERS-GOLDEN, M. Guanylyl cyclase and protein kinase G mediate nitric oxide suppression of 5-lipoxygenase metabolism in rat alveolar macrophages. **Biochim Biophys Acta**, v.1781(6-7), p. 299-305, 2008.
- COLOGNA, C.T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.ARANTES, E.C. Tityus serrulatus scorpion venom and toxins: an overview. **Protein Pept Lett**, v.16(8), p. 920-932, 2009.
- COLOGNA, C.T.; PEIGNEUR, S.; RUSTIGUEL, J.K.; NONATO, M.C.; TYTGAT, J.ARANTES, E.C. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. **FEBS J**, v.279(8), p. 1495-1504, 2012.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.; HERING, S.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WHEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.HADDAD JR, V. In *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Eds. **Sarvier, São Paulo**, p. 198-208, 2003.
- D'AVILA, H.; MELO, R.C.; PARREIRA, G.G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.BOZZA, P.T. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **J Immunol**, v.176(5), p. 3087-3097, 2006.
- DA SILVA CORREIA, J.; SOLDAU, K.; CHRISTEN, U.; TOBIAS, P.S.ULEVITCH, R.J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. **J Biol Chem**, v.276(24), p. 21129-21135, 2001.
- DAUPHINEE, S.M.KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Lab Invest**, v.86(1), p. 9-22, 2006.

- DE MATTOS, K.A.; SARNO, E.N.; PESSOLANI, M.C. BOZZA, P.T. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107 Suppl 1, p. 156-166, 2012.
- DEBIN, J.A.; MAGGIO, J.E. STRICHARTZ, G.R. Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. **Am J Physiol**, v.264(2 Pt 1), p. C361-369, 1993.
- DENAC, H.; MEVISSEN, M. SCHOLTYSIK, G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.362(6), p. 453-479, 2000.
- DORCE, V.A. SANDOVAL, M.R. Effects of *Tityus serrulatus* crude venom on the GABAergic and dopaminergic systems of the rat brain. **Toxicon**, v.32(12), p. 1641-1647, 1994.
- FERNANDES, C.M.; PEREIRA TEIXEIRA CDE, F.; LEITE, A.C.; GUTIERREZ, J.M. ROCHA, F.A. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-alpha and PGE2-dependent mechanisms. **Br J Pharmacol**, v.151(8), p. 1254-1261, 2007.
- FREIRE-MAIA, L. Pheripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v.14, p. 423-435, 1995.
- FREIRE-MAIA, L.; CAMPOS, J.A. AMARAL, C.F. Approaches to the treatment of scorpion envenoming. **Toxicon**, v.32(9), p. 1009-1014, 1994.
- FRUSCELLA, P.; SOTTOCORNO, M.; DI BRACCIO, M.; DIOMEDE, L.; PICCARDI, N.; CAGNOTTO, A.; GROSSI, G.; ROMANO, M.; MENNINI, T. ROMA, G. 1,5-Benzodiazepine tricyclic derivatives exerting anti-inflammatory effects in mice by inhibiting interleukin-6 and prostaglandinE(2) production. **Pharmacol Res**, v.43(5), p. 445-452, 2001.
- FUJIMOTO, Y.; ITABE, H.; SAKAI, J.; MAKITA, M.; NODA, J.; MORI, M.; HIGASHI, Y.; KOJIMA, S. TAKANO, T. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. **Biochim Biophys Acta**, v.1644(1), p. 47-59, 2004.
- FUKUHARA, Y.D.; REIS, M.L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA, F.Q. DONADI, E.A. 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**, v.41(1), p. 49-55, 2003.
- FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v.294(5548), p. 1871-1875, 2001.
- GARCIA, M.L.; GAO, Y.; MCMANUS, O.B. KACZOROWSKI, G.J. Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. **Toxicon**, v.39(6), p. 739-748, 2001.
- GHOSH, S. KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, v.109 Suppl, p. S81-96, 2002.
- GIANGIACOMO, K.M.; GARCIA, M.L. MCMANUS, O.B. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. **Biochemistry**, v.31(29), p. 6719-6727, 1992.
- GIANNOTTI, K.C.; LEIGUEZ, E.; MOREIRA, V.; NASCIMENTO, N.G.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; LOPES DE MELO, R. TEIXEIRA, C. A Lys49 phospholipase A2, isolated from *Bothrops asper* snake venom, induces lipid droplet formation in macrophages which depends on distinct signaling pathways and the C-terminal region. **Biomed Res Int**, v.2013, p. 807982, 2013.
- GIRARD, R.; PEDRON, T.; UEMATSU, S.; BALLOY, V.; CHIGNARD, M.; AKIRA, S. CHABY, R. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. **J Cell Sci**, v.116(Pt 2), p. 293-302, 2003.
- GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R. GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v.212(4490), p. 56-58, 1981.
- GUHA, M. MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cell Signal**, v.13(2), p. 85-94, 2001.
- GWEE, M.C.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R.M. CHEAH, L.S. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.29(9), p. 795-801, 2002.
- HAEGGSTROM, J.Z. FUNK, C.D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. **Chem Rev**, v.111(10), p. 5866-5898, 2011.

- HARDIMAN, G.; ROCK, F.L.; BALASUBRAMANIAN, S.; KASTELEIN, R.A.BAZAN, J.F. Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. **Oncogene**, v.13(11), p. 2467-2475, 1996.
- HARIZI, H.; CORCUFF, J.B.GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends Mol Med**, v.14(10), p. 461-469, 2008.
- HERSH, E.M.BODEY, G.P. Leukocytic mechanisms in inflammation. **Annu Rev Med**, v.21, p. 105-132, 1970.
- HIRATA, T.NARUMIYA, S. Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. **Adv Immunol**, v.116, p. 143-174, 2012.
- HORNG, T.MEDZHITOV, R. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98(22), p. 12654-12658, 2001.
- HU, X.; CHEN, J.; WANG, L.IVASHKIV, L.B. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v.82(2), p. 237-243, 2007.
- JONAS, P.; VOGEL, W.; ARANTES, E.C.GIGLIO, J.R. Toxin gamma of the scorpion Tityus serrulatus modifies both activation and inactivation of sodium permeability of nerve membrane. **Pflugers Arch**, v.407(1), p. 92-99, 1986.
- KAISHO, T.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; HOSHINO, K.AKIRA, S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. **J Immunol**, v.166(9), p. 5688-5694, 2001.
- KARIN, M.BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. **Annu Rev Immunol**, v.18, p. 621-663, 2000.
- KIRKLAND, T.N.; FINLEY, F.; LETURCQ, D.; MORIARTY, A.; LEE, J.D.; ULEVITCH, R.J.TOBIAS, P.S. Analysis of lipopolysaccharide binding by CD14. **J Biol Chem**, v.268(33), p. 24818-24823, 1993.
- KOLLI, D.; VELAYUTHAM, T.S.CASOLA, A. Host-Viral Interactions: Role of Pattern Recognition Receptors (PRRs) in Human Pneumovirus Infections. **Pathogens**, v.2(2), p., 2013.
- KRUMMEN, M.; BALKOW, S.; SHEN, L.; HEINZ, S.; LOQUAI, C.; PROBST, H.C.GRABBE, S. Release of IL-12 by dendritic cells activated by TLR ligation is dependent on MyD88 signaling, whereas TRIF signaling is indispensable for TLR synergy. **J Leukoc Biol**, v.88(1), p. 189-199, 2010.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int Rev Immunol**, v.30(1), p. 16-34, 2011.
- KUNZ, M.; IBRAHIM, S.; KOCZAN, D.; THIESEN, H.J.; KOHLER, H.J.; ACKER, T.; PLATE, K.H.; LUDWIG, S.; RAPP, U.R.; BROCKER, E.B.; VAN MUIJEN, G.N.; FLORY, E.GROSS, G. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma. **Cell Growth Differ**, v.12(3), p. 137-145, 2001.
- LENTSCHAT, A.; KARAHASHI, H.; MICHELSEN, K.S.; THOMAS, L.S.; ZHANG, W.; VOGEL, S.N.ARDITI, M. Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages. **J Immunol**, v.174(7), p. 4252-4261, 2005.
- LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F.SOBERMAN, R.J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **N Engl J Med**, v.323(10), p. 645-655, 1990.
- LI, Q.VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v.2(10), p. 725-734, 2002.
- LIN, C.C.; HSIEH, H.L.; SHIH, R.H.; CHI, P.L.; CHENG, S.E.YANG, C.M. Up-regulation of COX-2/PGE2 by endothelin-1 via MAPK-dependent NF-kappaB pathway in mouse brain microvascular endothelial cells. **Cell Commun Signal**, v.11(1), p. 8, 2013.
- LIU, G.YANG, H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity. **J Cell Physiol**, v.228(3), p. 502-512, 2013.
- LIU, P.; YING, Y.; ZHAO, Y.; MUNDY, D.I.; ZHU, M.ANDERSON, R.G. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. **J Biol Chem**, v.279(5), p. 3787-3792, 2004.

- LIU, X.; ZHAN, Z.; LI, D.; XU, L.; MA, F.; ZHANG, P.; YAO, H. CAO, X. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. **Nat Immunol**, v.12(5), p. 416-424, 2011.
- LUCAS, K. MAES, M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. **Mol Neurobiol**, v.48(1), p. 190-204, 2013.
- MACKICHAN, M.L. DEFRANCO, A.L. Role of ceramide in lipopolysaccharide (LPS)-induced signaling. LPS increases ceramide rather than acting as a structural homolog. **J Biol Chem**, v.274(3), p. 1767-1775, 1999.
- MAGALHAES, M.M.; PEREIRA, M.E.; AMARAL, C.F.; REZENDE, N.A.; CAMPOLINA, D.; BUCARETCHI, F.; GAZZINELLI, R.T. CUNHA-MELO, J.R. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v.37(8), p. 1155-1164, 1999.
- MAHAJAN, S.; DKHAR, H.K.; CHANDRA, V.; DAVE, S.; NANDURI, R.; JANMEJA, A.K.; AGREWALA, J.N. GUPTA, P. Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPARgamma and TR4 for survival. **J Immunol**, v.188(11), p. 5593-5603, 2012.
- MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; BENINATI, C.; PIRAINO, G.; VALENTI, A.; NICOCIA, G.; TETI, D.; COOK, J. TETI, G. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappa B are involved in TNF-alpha responses to group B streptococci. **J Immunol**, v.169(3), p. 1401-1409, 2002.
- MANSUELLE, P.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; DE LIMA, M.E.; ROCHAT, H. GRANIER, C. The beta-type toxin Ts II from the scorpion *Tityus serrulatus*: amino acid sequence determination and assessment of biological and antigenic properties. **Nat Toxins**, v.1(2), p. 119-125, 1992.
- MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A. LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v.25(12), p. 677-686, 2004.
- MARCUSSI, S.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R. MAZZI, M.V. Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. **1.ed. Ribeirão Preto, SP - FUNPEC-Editora.**, p., 2011.
- MARCUSSI, S.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R. MAZZI, M.V. Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. **1.ed. Ribeirão Preto, SP - FUNPEC-Editora.**, p., 2011.
- MARTIN, S.; DRIESSEN, K.; NIXON, S.J.; ZERIAL, M. PARTON, R.G. Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. **J Biol Chem**, v.280(51), p. 42325-42335, 2005.
- MARTIN, S. PARTON, R.G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.7(5), p. 373-378, 2006.
- MAYA-MONTEIRO, C.M.; ALMEIDA, P.E.; D'AVILA, H.; MARTINS, A.S.; REZENDE, A.P.; CASTRO-FARIANETO, H. BOZZA, P.T. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. **J Biol Chem**, v.283(4), p. 2203-2210, 2008.
- MAZZEI DE DAVILA, C.A.; DAVILA, D.F.; DONIS, J.H.; DE BELLABARBA, G.A.; VILLARREAL, V. BARBOZA, J.S. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. **Toxicon**, v.40(9), p. 1339-1346, 2002.
- MEANS, T.K.; LIEN, E.; YOSHIMURA, A.; WANG, S.; GOLENBOCK, D.T. FENTON, M.J. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. **J Immunol**, v.163(12), p. 6748-6755, 1999.
- MEDEIROS, A.I.; SA-NUNES, A.; SOARES, E.G.; PERES, C.M.; SILVA, C.L. FACCIOLI, L.H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infect Immun**, v.72(3), p. 1637-1644, 2004.
- MEDEIROS, A.I.; SILVA, C.L.; MALHEIRO, A.; MAFFEI, C.M. FACCIOLI, L.H. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. **Br J Pharmacol**, v.128(7), p. 1529-1537, 1999.

- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v.449(7164), p. 819-826, 2007.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454(7203), p. 428-435, 2008.
- MELO, R.C.; D'AVILA, H.; WAN, H.C.; BOZZA, P.T.; DVORAK, A.M.WELLER, P.F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **J Histochem Cytochem**, v.59(5), p. 540-556, 2011.
- MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos., p. Brasília, p.131., 1998.
- MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. (2011). "Acidentes por animais peçonhentos - Escorpiões. Aspectos edpidemiológicos." Retrieved 03/07/2011, from http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1537.
- MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. Casos de acidentes por escorpiões. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2011. **Sinan/SVS/MS - atualizado em 21/06/2012**, p., 2012.
- MOON, D.O.; PARK, S.Y.; LEE, K.J.; HEO, M.S.; KIM, K.C.; KIM, M.O.; LEE, J.D.; CHOI, Y.H.KIM, G.Y. Bee venom and melittin reduce proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **Int Immunopharmacol**, v.7(8), p. 1092-1101, 2007.
- MOREIRA, V.; GUTIERREZ, J.M.; AMARAL, R.B.; LOMONTE, B.; PURGATTO, E.TEIXEIRA, C. A phospholipase A(2) from Bothrops asper snake venom activates neutrophils in culture: expression of cyclooxygenase-2 and PGE(2) biosynthesis. **Toxicon**, v.57(2), p. 288-296, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65(1-2), p. 55-63, 1983.
- MULLER, G.J. Scorpionism in South Africa. A report of 42 serious scorpion envenomations. **S Afr Med J**, v.83(6), p. 405-411, 1993.
- MURPHY, R.C.GIJON, M.A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. **Biochem J**, v.405(3), p. 379-395, 2007.
- MURRAY, P.J.WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v.11(11), p. 723-737, 2011.
- NAGY, L.; TONTONAZ, P.; ALVAREZ, J.G.; CHEN, H.EVANS, R.M. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. **Cell**, v.93(2), p. 229-240, 1998.
- NASCIMENTO, E.B., JR.; COSTA, K.A.; BERTOLLO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.; ROCHA, L.T.; SOUZA, A.L.; GLORIA, M.B.; MORAES-SANTOS, T.COELHO, M.M. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion Tityus serrulatus. **Toxicon**, v.45(5), p. 585-593, 2005.
- NOGUEIRA-NETO, F.S.; AMORIM, R.L.; BRIGATTE, P.; PICOLO, G.; FERREIRA JR., W.A.; GUTIERREZ, V.P.; CONCEIÇÃO, I.M.; DELLA-CASA, M.S.; TAKAHIRA, R.K.; NICOLETTI, J.L.CURY, Y. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. . **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.91, p. 252-260, 2008.
- O'NEILL, L.A.BOWIE, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v.7(5), p. 353-364, 2007.
- O'NEILL, L.A.; GOLENBOCK, D.BOWIE, A.G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v.13(6), p. 453-460, 2013.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T.; GOMEZ-LAGUNAS, F.; GURROLA, G.B.POSSANI, L.D. A novel structural class of K+-channel blocking toxin from the scorpion Pandinus imperator. **Biochem J**, v.315 (Pt 3), p. 977-981, 1996.
- OWEN, J.L.MOHAMADZADEH, M. Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. **Front Physiol**, v.4, p. 159, 2013.
- OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; FONTENOT, J.D.; HAJJAR, A.M.; SMITH, K.D.; WILSON, C.B.; SCHROEDER, L.ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97(25), p. 13766-13771, 2000.

- PACHECO, P.; BOZZA, F.A.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.; WELLER, P.F.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. BOZZA, P.T. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. **J Immunol**, v.169(11), p. 6498-6506, 2002.
- PACHECO, P.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; GOMES, R.N.; BARBOSA-LIMA, G.; WERMELINGER, L.B.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; SILVA, A.R.; BOZZA, M.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BANDEIRA-MELO, C. BOZZA, P.T. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. **J Immunol**, v.179(12), p. 8500-8508, 2007.
- PAUL, W.E. Fundamental Immunology. . **Fourth edition, Lippencott-Raven Publishers, Philadelphia, New York.**, p., 1997.
- PEREIRA, P.A.; TRINDADE, B.C.; SECATTO, A.; NICOLETE, R.; PERES-BUZALAF, C.; RAMOS, S.G.; SADIKOT, R.; BITENCOURT CDA, S. FACCIOLI, L.H. Celecoxib improves host defense through prostaglandin inhibition during Histoplasma capsulatum infection. **Mediators Inflamm**, v.2013, p. 950981, 2013.
- PERES, C.M.; DE PAULA, L.; MEDEIROS, A.I.; SORGI, C.A.; SOARES, E.G.; CARLOS, D.; PETERS-GOLDEN, M.; SILVA, C.L. FACCIOLI, L.H. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of Mycobacterium tuberculosis. **Microbes Infect**, v.9(4), p. 483-489, 2007.
- PESSINI, A.C.; DE SOUZA, A.M.; FACCIOLI, L.H.; GREGORIO, Z.M. ARANTES, E.C. Time course of acute-phase response induced by Tityus serrulatus venom and TstX-I in mice. **Int Immunopharmacol**, v.3(5), p. 765-774, 2003.
- PESSINI, A.C.; SANTOS, D.R.; ARANTES, E.C. SOUZA, G.E. Mediators involved in the febrile response induced by Tityus serrulatus scorpion venom in rats. **Toxicon**, v.48(5), p. 556-566, 2006.
- PESSINI, A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R. ARANTES, E.C. A hyaluronidase from Tityus serrulatus scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v.39(10), p. 1495-1504, 2001.
- PETERS-GOLDEN, M. BROCK, T.G. Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.161(2 Pt 2), p. S36-40, 2000.
- PETRICEVICH, V.L. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.3(3), p. 325-332, 2004.
- PETRICEVICH, V.L. Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice treated with Centruroides noxius scorpion venom. **Mediators Inflamm**, v.2006(6), p. 54273, 2006.
- PETRICEVICH, V.L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators Inflamm**, v.2010, p. 903295, 2010.
- PETRICEVICH, V.L. PENA, C.F. The dynamics of cytokine d nitric oxide secretion in mice injected with Tityus serrulatus scorpion venom. **Mediators Inflamm**, v.11(3), p. 173-180, 2002.
- PETRICEVICH, V.L.; REYNAUD, E.; CRUZ, A.H. POSSANI, L.D. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from Tityus serrulatus. **Clin Exp Immunol**, v.154(3), p. 415-423, 2008.
- PILLAI, M.M.; HAYES, B. TOROK-STORB, B. Inducible transgenes under the control of the hCD68 promoter identifies mouse macrophages with a distribution that differs from the F4/80 - and CSF-1R-expressing populations. **Exp Hematol**, v.37(12), p. 1387-1392, 2009.
- PIMENTA, A.M.; LEGROS, C.; ALMEIDA FDE, M.; MANSUELLE, P.; DE LIMA, M.E.; BOUGIS, P.E. MARTIN-EAUCLAIRE, M.F. Novel structural class of four disulfide-bridged peptides from Tityus serrulatus venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v.301(4), p. 1086-1092, 2003.
- POL, A.; MARTIN, S.; FERNANDEZ, M.A.; FERGUSON, C.; CAROZZI, A.; LUETTERFORST, R.; ENRICH, C. PARTON, R.G. Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. **Mol Biol Cell**, v.15(1), p. 99-110, 2004.
- POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M. TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **Eur J Biochem**, v.264(2), p. 287-300, 1999.

- POSSANI, L.D.; MARTIN, B.M.; FLETCHER, M.D.FLETCHER, P.L., JR. Discharge effect on pancreatic exocrine secretion produced by toxins purified from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **J Biol Chem**, v.266(5), p. 3178-3185, 1991.
- POSSANI, L.D.; MERINO, E.; CORONA, M.; BOLIVAR, F.BECERRIL, B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, v.82(9-10), p. 861-868, 2000.
- RAJARAM, M.V.; BROOKS, M.N.; MORRIS, J.D.; TORRELLES, J.B.; AZAD, A.K.SCHLESINGER, L.S. Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. **J Immunol**, v.185(2), p. 929-942, 2010.
- RAMALINGAM, T.; RAJAN, B.; LEE, J.RAJAN, T.V. Kinetics of cellular responses to intraperitoneal *Brugia pahangi* infections in normal and immunodeficient mice. **Infect Immun**, v.71(8), p. 4361-4367, 2003.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R.C.POSSANI, L.D. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. **Toxicon**, v.46(8), p. 831-844, 2005.
- SAMUELSSON, B. The discovery of the leukotrienes. **Am J Respir Crit Care Med**, v.161(2 Pt 2), p. S2-6, 2000.
- SECATTO, A.; RODRIGUES, L.C.; SEREZANI, C.H.; RAMOS, S.G.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L.H.MEDEIROS, A.I. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. **PLoS One**, v.7(3), p. e31701, 2012.
- SECATTO, A.; SOARES, E.M.; LOCACHEVIC, G.A.; ASSIS, P.A.; PAULA-SILVA, F.W.; SEREZANI, C.H.; DE MEDEIROS, A.I.FACCIOLI, L.H. The leukotriene B(4)/BLT(1) axis is a key determinant in susceptibility and resistance to histoplasmosis. **PLoS One**, v.9(1), p. e85083, 2014.
- SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v.189(11), p. 1777-1782, 1999.
- SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; RUBINO, L.; PORTA, C.; TOTARO, M.G.; RIMOLDI, M.; BISWAS, S.K.; ALLAVENA, P.MANTOVANI, A. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol**, v.18(5), p. 349-355, 2008.
- SOFER, S.; GUERON, M.; WHITE, R.M.; LIFSHTIZ, M.APTE, R.N. Interleukin-6 release following scorpion sting in children. **Toxicon**, v.34(3), p. 389-392, 1996.
- SORGI, C.A.; SECATTO, A.; FONTANARI, C.; TURATO, W.M.; BELANGER, C.; DE MEDEIROS, A.I.; KASHIMA, S.; MARLEAU, S.; COVAS, D.T.; BOZZA, P.T.FACCIOLI, L.H. Histoplasma capsulatum cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. **J Immunol**, v.182(7), p. 4025-4035, 2009.
- SZATMARI, I.NAGY, L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. **EMBO J**, v.27(18), p. 2353-2362, 2008.
- TAKEDA, A.A.; DOS SANTOS, J.I.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L.B.; SOARES, A.M.FONTES, M.R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A(2) complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors at 1.9- and 1.45-Å resolution. **Biochim Biophys Acta**, v.1699(1-2), p. 281-284, 2004.
- TAKEDA, K.AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v.16(1), p. 3-9, 2004.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v.21, p. 335-376, 2003.
- TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T.; SANJO, H.; TAKADA, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.AKIRA, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v.11(4), p. 443-451, 1999.
- TANIGUCHI, T.; KOIDO, Y.; AIBOSHI, J.; YAMASHITA, T.; SUZAKI, S.KUROKAWA, A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. **Crit Care Med**, v.27(7), p. 1262-1264, 1999.

- TEIXEIRA, C.F.P.; GALANTE, F.; MANZOLI, S.; STEIL, A.A.JANCAR, S. Inflammatory reaction induced by Tityus serrulatus crude venom (TsV) in the lung of rats. **4th Symposium of SBTx - Reports - J. Venom. Anim. Toxins.**, v.3, p. 111, 1997.
- TEIXEIRA, J.R.; FONTOURA, B.F.; FREIRE-MAIA, L.; MACHADO, C.R.S.; CAMARGOS, E.R.S.TEIXEIRA, M.M. Evidence for a direct action of Tityus serrulatus scorpion venom on the cardiac muscle. **Toxicon**, v.39, p. 703-709, 2001.
- TYTGAT, J.; CHANDY, K.G.; GARCIA, M.L.; GUTMAN, G.A.; MARTIN-EAUCCLAIRE, M.F.; VAN DER WALT, J.J.POSSANI, L.D. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. **Trends Pharmacol Sci**, v.20(11), p. 444-447, 1999.
- VALDIVIA, H.H.POSSANI, L.D. Peptide toxins as probes of ryanodine receptor structure and function. **Trends Cardiovasc Med**, v.8(3), p. 111-118, 1998.
- VAN DISSEL, J.T.; VAN LANGEVELDE, P.; WESTENDORP, R.G.; KWAPPENBERG, K.FROLICH, M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. **Lancet**, v.351(9107), p. 950-953, 1998.
- VANE, J.BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB J**, v.1(2), p. 89-96, 1987.
- VASCONCELOS, F.; LANCHOTE, V.L.; BENDHACK, L.M.; GIGLIO, J.R.; SAMPAIO, S.V.ARANTES, E.C. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from Tityus serrulatus venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.141(1), p. 85-92, 2005.
- VIEIRA-DE-ABREU, A.; ASSIS, E.F.; GOMES, G.S.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; WELLER, P.F.; BANDEIRA-MELO, C.BOZZA, P.T. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.33(3), p. 254-261, 2005.
- WAN, H.C.; MELO, R.C.; JIN, Z.; DVORAK, A.M.WELLER, P.F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **FASEB J**, v.21(1), p. 167-178, 2007.
- WANG, C.; DENG, L.; HONG, M.; AKKARAJU, G.R.; INOUE, J.CHEN, Z.J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, v.412(6844), p. 346-351, 2001.
- WARNER, T.D.; GIULIANO, F.; VOJNOVIC, I.; BUKASA, A.; MITCHELL, J.A.VANE, J.R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96(13), p. 7563-7568, 1999.
- WEINLICH, R.; BORTOLUCI, K.R.; CHEHAB, C.F.; SEREZANI, C.H.; ULBRICH, A.G.; PETERS-GOLDEN, M.; RUSSO, M.AMARANTE-MENDES, G.P. TLR4/MyD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. **Cell Death Differ**, v.15(12), p. 1901-1909, 2008.
- WELLER, P.F.; RYEOM, S.W.; PICARD, S.T.; ACKERMAN, S.J.DVORAK, A.M. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. **J Cell Biol**, v.113(1), p. 137-146, 1991.
- YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, v.301(5633), p. 640-643, 2003.
- YANG, F.L.; HUA, K.F.; YANG, Y.L.; ZOU, W.; CHEN, Y.P.; LIANG, S.M.; HSU, H.Y.WU, S.H. TLR-independent induction of human monocyte IL-1 by phosphoglycolipids from thermophilic bacteria. **Glycoconj J**, v.25(5), p. 427-439, 2008.
- YANG, X.; ZHANG, G.; TANG, X.; JIAO, J.; KIM, S.Y.; LEE, J.Y.; ZHU, T.; LI, D.; YUN, Y.G.; GU, Q.PARK, H. Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappaB signaling pathway is involved in ACTG-toxin H-mediated anti-inflammatory effect. **Mol Cell Biochem**, v.374(1-2), p. 29-36, 2013.
- YU, W.; BOZZA, P.T.; TZIZIK, D.M.; GRAY, J.P.; CASSARA, J.; DVORAK, A.M.WELLER, P.F. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. **Am J Pathol**, v.152(3), p. 759-769, 1998.

-
- YU, W.; CASSARA, J.WELLER, P.F. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. **Blood**, v.95(3), p. 1078-1085, 2000.
- ZEGHAL, K.; SAHNOUN, Z.; GUINOT, M.; RICHER, C.GIUDICELLI, J.F. Characterization and mechanisms of the cardiovascular and haemodynamic alterations induced by scorpion venom in rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v.14(4), p. 351-361, 2000.
- ZHANG, X.; MAJLESSI, L.; DERIAUD, E.; LECLERC, C.LO-MAN, R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. **Immunity**, v.31(5), p. 761-771, 2009.

7. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.160.53.1), intitulado "Avaliação da Ativação Celular e Inflamação Induzida pelo Veneno Bruto do Escorpião *Tityus serrulatus* e suas Frações Ts1, Ts2, Ts6, Isoladamente", de autoria de **Karina Furlani Zoccal**, e de **Lúcia Helena Faccioli** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/06/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.160.53.1), entitled: "Avaliação da Ativação Celular e Inflamação Induzida pelo Veneno Bruto do Escorpião *Tityus serrulatus* e suas Frações Ts1, Ts2, Ts6, Isoladamente", by **Karina Furlani Zoccal** and **Lúcia Helena Faccioli**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 01, 2011.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro