

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

LUANA HENRIQUE DE MACEDO

**O papel do receptor CD14 na regulação metabólica de macrófagos
estimulados com peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***

Ribeirão Preto

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

LUANA HENRIQUE DE MACEDO

**O papel do receptor CD14 na regulação metabólica de macrófagos
estimulados com peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli.

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 10/08/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto – SP

2020

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

Macedo, Luana Henrique de

O papel do receptor CD14 na regulação metabólica de macrófagos estimulados com peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*. 64 fls.: il. 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências e Biotecnologia

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena

1. *Tityus serrulatus*; 2. Macrófagos; 3. Metabolismo; 4. CD14

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luana Henrique de Macedo

O papel do receptor CD14 na regulação metabólica de macrófagos estimulados com peçonha do escorpião *Tityus serrulatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador(a): Profa Dra Lúcia Helena Faccioli

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

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

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Processos nº 2018/10929-0 (bolsa); 2014/07125-6 (EMU);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Aleuciano Nobre de Macedo e Lindalva Henrique da Silva de Macedo por terem sempre me incentivado e apoiado em minhas escolhas, além de todo o suporte emocional. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela oportunidade e confiança. Muito obrigada pelo incentivo. Você é um exemplo de mulher e cientista.

Agradeço aos professores membros da banca examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos colaboradores Luiz Gustavo Gardinassi, Camila Oliveira, Jefferson Elias e Marcella Roverato, muito obrigada por toda a ajuda e suporte nos experimentos e análises dos resultados.

Aos meus queridos colegas do LIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) e LIME (Laboratório de Imunologia e Epigenética), Carol, Camila, Luiz Gustavo, Mouzarlem, Morgana, Grazielle, Amanda, Tanize, Marcella Furtado, Fabiana, Patrick e Felipe X, Humberto e Fabrícia por todo apoio e companhia dentro e fora do laboratório.

Um agradecimento mais que especial para meus amigos que tanto me ajudaram nos momentos mais difíceis e angustiantes da pós-graduação, Ana Paula, Felipe Lima, Jefferson, Marcella Roverato, Rayanne e Ricardo. Vocês foram meus anjos da guarda e para sempre serão meus irmãos de coração. Amo muito vocês parças!

À minha querida amiga irmã Fernanda pela companhia diária dividindo não só a casa, mas também experiências, conselhos e momentos inesquecíveis. Sua amizade foi fundamental para me manter perseverante em momentos de crise.

Aos meus pais, Lindalva e Luciano, sempre foram exemplos para mim e meus irmãos, nunca nos deixaram desamparados. Com toda a garra, caráter e amor nos criaram para sermos bons seres humanos. Meu coração é repleto de amor por vocês!

Aos meus irmãos por sempre me apoiarem e me ajudarem durante toda a vida.

Aos funcionários Caroline, Viviane e Carlos pelo suporte técnico.

Aos funcionários dos biotérios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio técnico na manutenção dos animais.

À secretária do programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, Ana Lúcia, pela disponibilidade e auxílio.

Ao programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, que foi essencial e de fundamental importância para a minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

MACEDO, L. H. **O papel do receptor CD14 na regulação metabólica de macrófagos estimulados com peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. 2020. 000f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* (TsV) é constituída por diversos compostos, os quais interagem com células do sistema imune inato e desencadeiam cascatas de sinalização que culminam no processo inflamatório. Em humanos, o envenenamento induz alterações em diversos órgãos, desregula canais iônicos e pode levar o paciente a óbito. Estudos recentes do nosso grupo descreveram que os macrófagos estão entre as principais células da imunidade inata que reconhecem o TsV. Esse reconhecimento é feito por diversos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), destacando-se o receptor CD14 presente na superfície dessas células, o qual quando ativado induz a produção de mediadores pró-inflamatórios. Recentemente foi observado que CD14 está associado a regulação metabólica de forma geral, visto que animais deficientes para essa molécula não se tornam obesos, e não desenvolvem resistência à insulina ou complicações cardíacas associadas à obesidade. Porém os mecanismos moleculares pelos quais o CD14 coordena a atividade metabólica de células do sistema imune ainda não foram elucidados. Desta forma propomos investigar o papel do CD14 no metabolismo de macrófagos derivados de medula óssea e macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e CD14^{-/-} após estímulo *in vitro* com TsV ou LPS. As alterações metabólicas, induzidas por LPS ou TsV, foram comparadas entre os macrófagos diferenciados da medula óssea (BMDMs), entre os residentes na cavidade peritoneal (MPs). Para tal finalidade, utilizamos a tecnologia de espectrometria de massas de alta resolução acoplada a cromatografia líquida, instrumentação de estado-da-arte no campo da metabolômica e biologia de sistemas. Os dados foram analisados por meio de programas de biologia computacional especificamente delineados para análises estatísticas e análises funcionais.

Nossos resultados demonstraram que a molécula CD14 contribui para a perturbação de vias metabólicas distintas entre BMDMs e MPs, as quais diferem de acordo com o estímulo utilizado, mas que incluem metabolismo de aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e ciclo da ureia. Os resultados deste projeto apresentam grande potencial para o delineamento de novas estratégias terapêuticas no envenenamento por TsV e doenças/condições relacionadas.

Palavras chave: *Tityus serrulatus*, macrófagos, metabolismo, CD14

ABSTRACT

MACEDO, L. H. **The role of CD14 receptor on the metabolic regulation of macrophages stimulated with the venom from *Tityus serrulatus* scorpion.** 2020. 000f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The venom of *Tityus serrulatus* scorpion (TsV) is constituted by several compounds, which interact with innate immune cells and trigger signaling cascades that culminate on the inflammatory process. In humans, TsV envenomings induce alterations in several organs, deregulate ionic channels and can be fatal. Recent studies from our group described that macrophages are one of the main innate immune cells to recognize TsV. This process is performed by pattern recognition receptors (PRRs), in which the CD14 receptor is presented in macrophage surfaces, which when activated, results in the production of pro-inflammatory mediators. Recent observations implicate CD14 on a general metabolic regulation, since CD14-deficient animals do not become obese and they do not develop insulin resistance or cardiac complications associated to obesity. However, the molecular mechanisms by which CD14 coordinates the metabolic activity of immune system cells have not been elucidated. In this project, we investigate the role of CD14 on the metabolism of bone marrow derived macrophages (BMDMs) and peritoneal macrophages (MPs) of C57BL/6 and CD14^{-/-} after the stimulation with TsV or LPS. We evaluated metabolic alterations resulting from the two stimuli, which were also compared between different bone marrow derived macrophages or residents in the peritoneal cavity. For this purpose, we used high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography, a state-of-art technology on the field of metabolomics and systems biology. The data were analyzed using computational biology programs specifically designed for statistical analysis and functional analysis. The data were analyzed using computational biology programs specifically designed for statistical

analysis and functional analysis. Our results demonstrated that the CD14 molecule contributes to the disturbance of different metabolic pathways between BMDMs and MPs, which are different according to the stimulus received, but include metabolism of amino acids, fatty acids, vitamins and urea cycle. This project has great potential for the design of new therapeutic strategies in TsV poisoning and related diseases/conditions.

Key words: *Tityus serrulatus*, macrophage, metabolism, CD14.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estímulo com LPS por 24 horas induziu a liberação de óxido por BMDMs ou MPs.....	34
Figura 2: TsV, LPS e a ausência do receptor CD14 induzem diferenças nos compostos ionizados	36
Figura 3: Dinâmica da abundância diferencial de metabólitos após estímulo de BMDMs com TsV e L.....	37
Figura 4: Gráfico de Manhattan representando metabólicos diferencialmente abundantes em BMDMs da linhagem selvagem (C57BL/6) e da deficiente de CD14 (CD14 ^{-/-}), de acordo com o tempo e estímulo	38
Figura 5: Estímulos com LPS ou TsV desencadeiam diferentes mudanças no perfil metabólico de BMDMs CD14 ^{-/-} em relação aos C57BL/6 (WT)	39
Figura 6: Diferenças nos compostos ionizados causadas por TsV, LPS e ausência do receptor CD14.	41
Figura 7: Diferenças entre metabólitos produzidos por MPs de animais C57BL/6 após estímulos com TsV ou LPS.....	42
Figura 8: Gráfico de Manhattan representando metabólicos diferencialmente abundantes em MPs da linhagem selvagem (C57BL/6) e da deficiente de CD14 (CD14 ^{-/-}), de acordo com o tempo e estímulo.....	43
Figura 9: Estímulos com LPS ou TsV desencadeiam diferentes mudanças no perfil metabólico de BMDMs CD14 ^{-/-} em relação aos C57BL/6 (WT).....	44
Figura 10: CD14 controla a produção de mediadores lipídicos em BMDMs.....	45
Figura 11: A produção de prostanoídes é parcialmente regulada por CD14 em MPs.....	46
Figura 12: TsV ou LPS induzem a produção IL-1 β por BMDMs C57BL/6 (WT) e CD14 ^{-/-}	47
Figura 13: A ausência de CD14 não prejudicou a produção IL-1 β por MPs estimulados com LPS ou TsV.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Padrões analíticos empregados para a identificação e quantificação de mediadores lipídicos.....	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

AP-1: Proteína Ativadora 1

BMDMs: Macrófagos derivados de medula óssea

DAMPs: Padrões Moleculares Associados ao Dano

ETC: Cadeia transportadora de elétrons

GM-CSF: Fator estimulador de Colônias de Granulócito-Monócito

HFD: Dieta rica em lipídeos

HIF1 α : Fator 1-alfa induzível por hipóxia

IFN- γ : Interferon- γ

IL -6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-13: Interleucina-13

IL-1 α : Interleucina-1 α

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-23: Interleucina-23

IL-4: Interleucina-4

IL-8: Interleucina-8

IRF3: Fator de resposta ao Interferon 3

K⁺: Potássio

LBP: Proteína sérica de ligação do LPS

LPS: Lipopolissacarídeo

LTB4: Leucotrieno B4

M1: Macrófago M1

M2: Macrófago M2

MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MD-2: Proteína acessória

MPs: Macrófagos peritoneais

MyD88: Molécula Adaptadora de Diferenciação Mieloide 88

Na⁺: Sódio

NF-κB: Fator Nuclear kappa B

NO: Óxido Nítrico

oxPAC: Lipídios oxidados

OXPHOS: Fosforilação oxidativa

PAMPs: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PGE₂: Prostaglandina E₂

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões

Ptgds: PGD2 sintase

Ptges2: PGE2 sintase

Ptgs2: COX-2, isoforma induzida

sCD14: CD14 solúvel

SDH: succinato desidrogenase

TCA: Ciclo do ácido tricarboxílico

TIRAP: Proteína adaptadora contendo o domínio TIR

TLR: Toll Like Receptor

TLR1: Receptor Semelhante a Toll 1

TLR2: Receptor Semelhante a Toll 2

TLR3: Receptor Semelhante a Toll 3

TLR4: Receptor Semelhante a Toll 4

TLR5: Receptor Semelhante a Toll 5

TLR6: Receptor Semelhante a Toll 6

TLR7: Receptor Semelhante a Toll 7

TLR8: Receptor Semelhante a Toll 8

TLR9: Receptor Semelhante a Toll 9

TLR10: Receptor Semelhante a Toll 10

TLR11: Receptor Semelhante a Toll 11

TLR12: Receptor Semelhante a Toll 12

TLR13: Receptor Semelhante a Toll 13

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral-α

TRAM: Proteína da cadeia de translocação associada à membrana

TRIF: Adaptador indutor de interferon- β contendo domínio TIR

Ts1, Ts2, Ts6: Toxinas isoladas do TsV

TsV: *Tityus serrulatus* Venom

VAMPs: Padrões Moleculares Associados a Veneno

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Escorpionismo: aspectos gerais.....	19
1.2 Resposta inflamatória induzida pela peçonha do <i>T. serrulatus</i>	20
1.3 Macrófagos: Origens e funções.....	21
1.4 Macrófagos e seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares.....	22
1.5 Metabolismo de macrófagos	24
1.6 CD14 e metabolismo celular.....	25
2. HIPÓTESE.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Obtenção da peçonha bruta de <i>Tityus serrulatus</i>	29
4.3 Eutanásia.....	29
4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais.....	29
4.5 Diferenciação de macrófagos a partir de células da medula óssea (BMDM)	30
4.6 Estímulo de macrófagos com TsV ou com LPS	30
4.7 Análise global de metabólitos por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS)	31
4.8 Quantificação de mediadores lipídicos.....	31
4.9 Análises estatísticas.....	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Padronização dos métodos para obtenção e ativação de macrófagos peritoneais (MPs) e diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6.....	34
5.2 Alterações metabólicas induzidas por TsV ou LPS em BMDMs obtidos de animais C57BL/6 ou CD14 ^{-/-}	34
5.3 Dinâmica da resposta metabólica de BMDMs estimulados com TsV ou com LPS.....	36
5.4 A ausência de CD14 altera o perfil metabólico de BMDMs estimulados com TsV ou LPS	37
5.6 Dinâmica da resposta metabólica de MPs estimulados com TsV e LPS.....	41
5.7 A ausência de CD14 altera o perfil metabólico de MPs estimulados com TsV e LPS.....	42
5.4. Produção de eicosanoides após estímulos com TsV ou LPS em BMDMs obtidos de animais C57BL/6 ou CD14 ^{-/-}	44
5.5 Produção de eicosanoides por MPs obtidos de animais C57BL/6 ou CD14 ^{-/-} após estímulos com TsV ou LPS.....	45

5.6 Produção de IL-1 β por BMDMs de animais C57BL/6 (WT) e CD14 ^{-/-} estimulados <i>in vitro</i> com TsV ou LPS.....	45
5.7 Produção de IL-1 β por MPs de animais C57BL/6 (WT) e CD14 ^{-/-} estimulados <i>in vitro</i> com TsV ou LPS.....	46
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS	53
9. ANEXO	1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Escorpionismo: aspectos gerais

Os escorpiões são artrópodes, da classe dos aracnídeos e da ordem *Scorpiones* e constituem um importante problema de saúde pública. Existem cerca de 2.000 espécies de escorpião descritas, e destas, em torno de 30 são consideradas virtualmente perigosas para o ser humano, principalmente aquelas pertencentes à família *Buthidae*. No Brasil, os escorpiões do gênero *Tityus* são responsáveis pelo maior número de casos de envenenamento, com realce para a espécie *Tityus serrulatus*, conhecido como escorpião amarelo. Mais de 50% dos acidentes por animais peçonhentos são causados por escorpiões e em alguns casos pode ser fatal (CASELLA-MARTINS et al., 2015; ZOCCAL et al., 2016).

Desde as primeiras notificações até os dias atuais os casos de acidentes com escorpiões têm aumentado devido a adaptabilidade deste animal as áreas urbanas. A capacidade destes animais sobreviverem nesse ambiente é favorecida pelo acúmulo de lixo, que atrai insetos como baratas, e conseqüentemente os escorpiões (CRUZ et al., 1995; LOURENÇO, 2008; PUCCA et al., 2015b). *T. serrulatus* se reproduz por partenogênese e continua a procriar após longos períodos de abstinência alimentar. Além disso não existem produtos químicos eficazes para o controle desse animal. Este conjunto de fatores propicia a atração e manutenção dos escorpiões no ambiente urbano e é responsável pelo aumento no número de acidentes (COLOGNA et al., 2009; RECKZIEGEL; LAERTE; JR, 2014; PUCCA et al., 2015^a; PIMENTA et al., 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A peçonha de *T. serrulatus* (TsV) é constituída por múltiplos componentes, tais como muco, sais inorgânicos, lipídios, amins, nucleotídeos, enzimas, peptídeo natriurético, proteínas com alta massa molecular, peptídeos, aminoácidos livres, carboidratos e neurotoxinas (PUCCA et al., 2015). A síndrome de envenenamento pode variar de leve, na qual o paciente apresenta dores leves e parestesia; moderada, com dores locais intensas, sudorese, náuseas, vômitos, taquicardia, taquipneia e hipertensão; até a forma grave, que além dos sintomas presentes nos casos moderados, os pacientes também apresentam manifestações neurológicas, transpiração profusa, vômitos incontroláveis, salivação excessiva, alternância entre agitação e exaustão, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar, choque, convulsões e coma (COLOGNA et al., 2009). Muitos destes efeitos acontecem devido a intensa liberação de neurotransmissores como

acetilcolina, noradrenalina e adrenalina (CUSINATO et al., 2010; MIYAMOTO et al., 2018), de citocinas e mediadores lipídicos (FUKUHARA, et al. 2003; ZOCCAL et al., 2016).

As toxinas escorpiônicas também podem agir nos canais iônicos. As que agem nos canais de para Na⁺, como por exemplo as toxinas Ts1 e Ts2, são responsáveis pelas ações neurotóxicas (β -toxinas). Elas se ligam a esses canais e hiperpolarizam a membrana celular, reduzindo a potência e aumentando a duração do potencial de ação. Ts6 é uma α -neurotoxina seletiva para os canais de K⁺, acarretando bloqueio reversível destes íons. As moléculas desta classe de neurotoxinas geralmente são compostas por aminoácidos de cadeia curta ligados por 3 ou 4 pontes dissulfeto (COLOGNA et al., 2009; PUCCA et al., 2015a)

O tratamento para o escorpionismo varia de acordo com a gravidade do caso. Frequentemente os pacientes recebem anestésicos, analgésicos e compressas no local da picada para aliviar dor local, e se necessário, são submetidos a procedimentos para preservação das funções vitais, como ventilação mecânica, hidratação e suplemento de oxigênio e administração do soro (ISBISTER; SALUBA BAWASKAR, 2014). A terapia com soro antiescorpiônico ainda é muito discutida, uma vez que o uso do mesmo não garante completamente a ausência de manifestações cardíacas, especialmente nos casos graves (CUPO, 2015). Apesar da divergência entre os profissionais de saúde, o protocolo clínico de tratamento é a administração de soro em crianças com idade inferior a 7 anos, 3 ampolas de soro para casos moderados, e 6 ampolas de soro para casos graves (CUPO, 2015).

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

O envenenamento pelo escorpião resulta em processo inflamatório complexo que se assemelha a síndrome da resposta inflamatória sistêmica e à sepse aguda (CUPO, 2015, ZOCCAL et al., 2016). Após a picada, as células do sistema imune inato reconhecem os componentes da peçonha, os quais se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e ativam vias pró-inflamatórias que mediam o edema pulmonar e, eventualmente, morte (ZOCCAL et al., 2014, 2016, 2018a).

Embora estudos relatem as manifestações clínicas e o aumento dos níveis séricos de mediadores inflamatórios em pacientes envenenados pela peçonha do escorpião amarelo (MAGALHÃES et al., 1999), apenas alguns trabalhos descrevem a possível

correlação entre a inflamação e a fisiopatologia do escorpionismo (CUPO et al., 1994; KUMAR et al., 2012). O envenenamento por TsV induz leucocitose e recrutamento de neutrófilos para os pulmões, além acentuada produção de citocinas e inflamação sistêmica, com aumento das concentrações plasmáticas de interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-6, IL-8, interferon- γ (IFN- γ), fator estimulador de colônias de granulócito-monócito (GM-CSF) e IL-10 (MAGALHÃES et al., 1999; FUKUHARA et al., 2003; ZOCCAL et al., 2016). Estudos utilizando macrófagos estimulados com TsV demonstraram que a peçonha induz a produção dose-dependente de interferon- γ (IFN γ), IL-6 e óxido nítrico (NO) (PETRICEVICH, 2002), IL-1 α , IL-1 β e IL-10 (PETRICEVICH; LEBRUN, 2005; PETRICEVICH et al., 2007; ZOCCAL et al., 2018a) Zoccal et al (2013) demonstraram que macrófagos também respondem a Ts1, Ts2 e Ts6, toxinas purificadas do TsV. Após interação com essas toxinas, macrófagos murinos J774.1 liberam mediadores da resposta inflamatória como IL-6, TNF- α , prostaglandina E2 (PGE₂) e leucotrieno B4 (LTB₄) (ZOCCAL, et al., 2011; ZOCCAL et al., 2013).

1.3 Macrófagos: Origens e funções

Os macrófagos estão presentes na maioria dos vertebrados e suas funções variam de acordo com o tecido em que se encontram. Por exemplo, osteoclastos são macrófagos ósseos que reabsorvem matriz óssea; os macrófagos alveolares pulmonares são responsáveis pela renovação de moléculas de surfactantes produzidas nos alvéolos, e eliminação de microrganismos ou partículas inalados (WANG et al., 2018), micróglia, ou macrófagos cerebrais, tem função do sistema nervoso central; os macrófagos esplênicos de polpa vermelha são importantes para o processamento de heme e ferro de glóbulos vermelhos em processo de envelhecimento, entre outras funções (GEISSMANN et al., 2010; ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2005). A diversidade dos macrófagos tecido-específicos é uma questão muito debatida, e vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de elucidar a origem destas células. Células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea dão origem aos monócitos circulantes, os quais podem se diferenciar em macrófagos quando se infiltram nos tecidos. Entretanto, um estudo revelou em camundongos, que uma população de macrófagos tem origem no saco vitelínico no 8º dia do estágio embrionário e são independentes de células da medula óssea. Estas células se estabelecem em órgãos como fígado, sistema nervoso central e epiderme (SCHULZ et al., 2012; TAKATA et al., 2017). Os macrófagos peritoneais também são originados de um precursor embrionário e assim como grande parte das células tecido-residentes, se

mantém por meio de auto-renovação. Macrófagos peritoneais exercem funções críticas no controle de infecções e patologias inflamatórias, assim como na manutenção da homeostase (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI, 2015). Recentemente, nosso grupo demonstrou que macrófagos peritoneais e macrófagos diferenciados de medula óssea apresentam perfil distinto na produção de eicosanoides (SORGI, et al., 2017), corroborando diferentes funções exercidas por estas células de origens distintas.

Estímulos nocivos, como o envenenamento por escorpião, lesões ou infecções ativam a resposta imune inata (MOONEY et al., 2014, ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014). Os macrófagos são células críticas no início desta resposta e apresentam um espectro de ativação de acordo com o estímulo (XUE et al., 2014), e têm sido comumente classificados como M1 ou M2. A ativação clássica ocorre em resposta ao IFN γ e ligantes de Toll Like Receptor (TLR) como o LPS, e se caracteriza pela liberação de IL-12, IL-23, NO, espécies reativas de oxigênio (EROs), o que torna macrófagos M1 células efetoras potentes durante o processo inflamatório e o combate a microrganismos (AKIRA et al., 2013; MANTOVANI et al., 2004; OWEN & MOHAMADZADEH, 2013). A ativação alternativa ocorre após a exposição a interleucinas como IL-4, IL-10 e IL-13 (LIU & YANG, 2013). Essas células são essenciais para resolução da inflamação, atuando na eliminação de restos celulares, reparação e remodelação de tecidos lesados (MANTOVANI et al., 2004; SICA et al., 2008). Assim, o equilíbrio entre esses dois subtipos celulares e as moléculas produzidas por eles são importantes para a homeostase. De fato, fatores como envenenamento por peçonha de escorpião perturbam a homeostase de um organismo como um todo, e pode resultar em resposta inflamatória exacerbada associada a estados graves como choque, falência múltipla de órgãos, e desfecho fatal. (PETRICEVICH, 2004; PETRICEVICH, 2006; PETRICEVICH, 2010)

1.4 Macrófagos e seus receptores de reconhecimento de padrões moleculares

Macrófagos distinguem sinais nocivos por meio de sinalização mediada por PRRs, que reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), como LPS derivados de bactérias Gram-negativas (PARK; LEE, 2013), beta-glucana derivada de fungos (HERRE; GORDON; BROWN, 2004; SORGI et al., 2017); padrões moleculares associados a dano (DAMPs) como restos celulares, dano tecidual e células em apoptose; e padrões moleculares associados a venenos (VAMPs) como toxinas derivadas de peçonhas (ZOCCAL et al., 2014). Tais receptores localizam-se em diversos

compartimentos celulares, como na membrana plasmática ou nos endossomos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; ZANONI; GRANUCCI, 2013). Dentre os PRRs, os mais bem estudados são os Toll-Like Receptors (TLRs), que podem ser de 13 tipos diferentes (TLR1- TLR13) (VIJAY, 2018). TLR4 foi o primeiro receptor descrito, e este tem a capacidade de detectar moléculas presentes na superfície de agentes patogênicos, como LPS produzido por bactérias Gram-negativas, peçonha de escorpião e heme (BAUMANN et al., 2010, GIOIA; ZANONI, 2014, ZOCCAL et al., 2014; VALLELIAN et al., 2018).

A sinalização intracelular desencadeada após interação entre PAMPs e TLRs é mediada por proteínas adaptadoras, como a molécula adaptadora de diferenciação mielóide 88 (MyD88), além do adaptador indutor de Interferon- β contendo domínio TIR (TRIF), proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP) e proteína da cadeia de translocação associada à membrana (TRAM). Quando ativadas, estas moléculas se deslocam para o núcleo da célula e ativam fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora 1 (AP-1), os quais controlam a expressão de genes inflamatórios e anti-inflamatórios (WINKLER et al., 2017), como exemplo *I11b*, *I110*, *Ptges*, *Ptgs2*, *Tnfa* e *Nos2* (YANG; WU; WANG, 2016).

Em diversas ocasiões, o reconhecimento do ligante por um TLR necessita da atuação de co-receptores presentes na membrana celular, ou que são secretados. O CD14 é uma glicoproteína conhecida por desempenhar essa função (GIOIA; ZANONI, 2014). Localiza-se na superfície de alguns tipos celulares, como os macrófagos e neutrófilos, e também pode estar presente na membrana de células não mielóides (BAUMANN et al., 2010; ZANONI, 2013; JERSMANN, 2005). Além disso, CD14 é encontrada em fluídos biológicos na forma solúvel (sCD14) (BAZIL et al., 1986). Em várias condições inflamatórias como sepse, alergia ou envenenamento por escorpião, os monócitos e macrófagos liberam sCD14 (SHIVE et al., 2015; ZOCCAL et al., 2018a). Por estar envolvida no reconhecimento de estruturas de microrganismos como o LPS, e participar da resposta imune inata, o CD14 também é considerado um PRR, podendo sinalizar de forma dependente ou independente de TLRs (PUGIN et al., 1994; WRIGHT, 1995; ZANONI, 2009).

A interação entre CD14 e TLRs foi primeiramente descrita devido à sua capacidade de reconhecer LPS (HAILMAN et al., 1994; WRIGHT et al., 1990), fato que mostrou que o CD14 é um co-receptor de TLR4, e necessário para sinalização intracelular (CHOW et al., 1999; POLTORAK et al., 1998). O CD14 também pode interagir com outros TLRs,

como TLR1 e TLR2 (ELASS et al., 2005; RABY et al., 2013), TLR3 (LEE et al., 2006), TLR7 e TLR9 (BAUMANN et al., 2010). Além da interação do CD14 com TLR4, a resposta celular a bactérias Gram-negativas ou LPS é mediada com a participação de outras moléculas acessórias, como a proteína sérica de ligação do LPS (LBP) e a proteína acessória MD-2 (GIOANNINI; WEISS, 2007; MIYAKE, 2007). A LBP captura e transfere o LPS para o CD14, que com auxílio da MD-2 o entrega para o TLR4, (GIOANNINI et al., 2005; PARK; LEE, 2013). Após ativado, o TLR4 sinaliza por vias dependentes de TIRAP-MyD88 levando a ativação das vias do NF- κ B e da MAPK (WANG et al., 2001). Além disso, o estímulo com LPS pode ativar a via independente de MyD88, a qual é desencadeada por TRAM-TRIF e ativa o do fator de resposta ao Interferon 3 (IRF3). (AKIRA; HOSHINO, 2003). Esse último processo ocorre nos endossomos após internalização do complexo CD14-TLR4-MD-2 (ZANONI et al., 2011).

Amplamente estudado devido ao seu papel como receptor de LPS, o CD14 também é necessário na produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos (ZOCCAL et al., 2014, 2018a). Sua inibição protege o organismo contra danos e necrose, visto que o processo inflamatório induzido pelo LPS é menos intenso devido a menor liberação de citocinas pró inflamatórias (SCHIMKE et al., 1998; LETURCQ et al., 1996; SCHIMKE et al., 1998). Macrófagos competentes para CD14 liberam altas concentrações de IL-6, TNF- α e PGE₂ após estímulo com TsV *in vitro*, porém menos LTB₄. No entanto, ausência de CD14 resulta no aumento da liberação de LTB₄ e diminuição de PGE₂ (ZOCCAL et al., 2014; ZOCCAL et al., 2018a). Além disso, foi demonstrado *in vivo*, que essa molécula é necessária para a produção de PGE₂, monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e IL-1 β , que medeiam a inflamação e a morte de animais envenenados por TsV (ZOCCAL et al., 2018a). Em conjunto, estes dados fornecem evidências importantes sobre alterações moleculares induzidas pelo TsV, assim como sobre o papel fundamental do CD14 na ativação de macrófagos por esta peçonha.

1.5 Metabolismo de macrófagos

A dinâmica do metabolismo de células do sistema imune inato, como macrófagos, está intimamente relacionada com a ativação e funções efetoras destas células (HOTAMISLIGIL, 2017). Assim, os macrófagos inflamatórios (M1) metabolizam o aminoácido L-arginina para produzir NO, enquanto os macrófagos M2 metabolizam o mesmo substrato para produzir arginina (MILLS; KINCAID; ALT; HEILMAN; HILL,

2000). Desta forma, essas células são reprogramadas metabolicamente para ativar vias opostas e gerar energia após a polarização (ONEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016; BOSSCHE; O'NEILL; MENON, 2017). Os estudos que abordam o imunometabolismo de macrófagos demonstraram que macrófagos M2 ativados por IL-4 dependem principalmente da fosforilação oxidativa (OXPHOS) para produção de energia (BOSSCHE; O'NEILL; MENON, 2017). Em contraste, após a ativação com LPS apenas ou em combinação com IFN- γ , os macrófagos M1 apresentam reprogramação metabólica de OXPHOS em direção à glicólise. A reprogramação de macrófagos M1 em direção à glicólise é acompanhada de duas “quebras” no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) e inibição de partes da cadeia de transporte de elétrons (ETC) nas mitocôndrias (ONEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). As quebras no ciclo do TCA são ocasionadas pela menor atividade e expressão da isocitrato desidrogenase e da succinato desidrogenase (SDH). Estes fatos levam ao acúmulo de citrato e succinato, os quais são transportados para fora das mitocôndrias, e quando no citosol contribuem para a produção de NO, ocasionando a inibição da ETC, desta forma estabiliza o fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF1 α). Assim sendo, ocorre ativação da via glicolítica que leva a inflamação devido ao aumento de IL-1 β (TANNAHILL et al., 2013). Portanto, a reprogramação do metabolismo oxidativo para a glicólise ativa as vias inflamatórias nos macrófagos M1.

1.6 CD14 e metabolismo celular

Além das funções clássicas do CD14 no reconhecimento de padrões moleculares, esta molécula tem sido implicada na regulação metabólica de forma geral. Foi descrito que, apesar do ganho de peso ser semelhante nos camundongos selvagens (WT) e nos deficientes de CD14 (CD14^{-/-}) obesos, animais transgênicos apresentaram adipócitos menores, níveis mais baixos de glicemia em jejum, controle da intolerância à glicose e diminuição da pressão arterial. Também camundongos CD14^{-/-} magros ou obesos apresentaram menos células de Kupffer quando comparados com os respectivos grupos WT. Estas diferenças são ainda mais contrastantes com o aumento da idade, e tem como consequência o fato dos animais CD14^{-/-} apresentarem maior longevidade (ZANONI; GRANUCCI, 2013). Desta forma, animais CD14^{-/-} apesar de se tornarem obesos recebendo alimentações enriquecidas com lipídios, tem menos chances de desenvolverem patologias relacionadas com a obesidade, como diabetes e complicações cardiovasculares (RONCON-ALBUQUERQUE et al., 2008).

Dados recentes fornecem mais evidências da importância do receptor CD14 no metabolismo. Utilizando um modelo de obesidade induzida por dieta rica em lipídeos e estímulo com LPS *in vivo*, Luche et al (2013), mostraram que a proliferação e diferenciação de precursores adiposos e o acúmulo de macrófagos na própria camada de gordura são dependentes de CD14, favorecendo um ambiente inflamatório. Sendo assim, no excesso de energia disponível, ou seja, uma dieta rica em gorduras e carboidratos, favorece o aumento de adipócitos e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças metabólicas (LUCHE et al., 2013).

CD14 é crucial para ativação de células do sistema imune inato, como macrófagos e monócitos, em resposta a uma variedade de estímulos que incluem LPS, lipídios oxidados (oxPAC) e TsV. Ainda, macrófagos estimulados por LPS aumentam sua capacidade glicolítica para atenderem as demandas energéticas da ativação celular, enquanto macrófagos estimulados com oxPAC utilizam a respiração mitocondrial, alimentam o ciclo de Krebs com glutamina e favorecem o acúmulo de oxaloacetato no citoplasma. Este metabólito potencializa a produção de IL-1 β levando a exacerbação da inflamação em camundongos e humanos hipercolesterêmicos (GIOIA; SPREAFICO; SPRINGSTEAD; MENDELSON; JOEHANES; LEVY; ZANONI, 2019). Em conjunto, esses estudos sugerem que a sinalização por CD14 pode controlar diversas funções celulares por meio da modulação do metabolismo de macrófagos.

2. HIPÓTESE

Macrófagos são células cruciais para iniciar a resposta inflamatória/imune durante processos patogênicos como os causados por envenenamento pelo escorpião *T. serrulatus*, infecções ou mesmo aqueles induzidos por células mortas. Esses eventos iniciam-se após o reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos, produtos liberados após dano celular ou ainda padrões moleculares associados aos venenos. Estas moléculas são reconhecidas por receptores da imunidade inata presentes nos macrófagos, entre eles o CD14. Este receptor tem função crítica no reconhecimento de TsV, que culmina na produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos. CD14 é fundamental para ativação ou regulação de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios bioativos, como a PGE₂ e LTB₄, além de promover a produção de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6.

Sabe-se que a ativação de macrófagos leva a alterações no seu perfil metabólico, o qual está intimamente ligado às suas funções efetoras. Embora TsV induza produção de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos, seu fenótipo metabólico frente ao estímulo com TsV ainda não é conhecido. Nós hipotetizamos de que o receptor CD14 é importante não somente para o reconhecimento de padrões moleculares presentes no TsV, mas também seria um regulador da resposta metabólica de macrófagos e outras células do sistema imune inato. Além disso, ponderamos que após o reconhecimento de moléculas presentes no TsV ou mesmo LPS, o CD14 estaria sinalizando tanto por vias dependentes quanto independentes de TLR para induzir ou reprimir a expressão de genes codificantes de enzimas que coordenam o metabolismo celular e conseqüentemente a ativação da célula.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel do receptor CD14 na regulação de vias metabólicas em macrófagos murinos estimulados com TsV ou LPS.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar se o estímulo com TsV (ou com LPS) induz alterações metabólicas em macrófagos peritoneais e em macrófagos obtidos de medula óssea de camundongos selvagens C57BL/6 (WT) ou deficientes de CD14 (CD14^{-/-});

Avaliar se as alterações metabólicas induzidas pelo TsV (ou LPS) são diferentes em macrófagos derivados de camundongos C57BL/6 (WT) quando comparados com os de CD14^{-/-};

Avaliar se as alterações metabólicas induzidas por TsV (ou LPS) são diferentes quando comparados macrófagos derivados de medula com macrófagos peritoneais isolados de camundongos C57BL/6 (WT) e CD14^{-/-};

Comparar as reações metabólicas desencadeadas por TsV e LPS em ambos os tipos de macrófagos em animais selvagens (WT) ou deficientes de CD14.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia de Parasitoses (LIIP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP – Campus Ribeirão Preto).

4.1 Animais

Nos experimentos foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 e CD14^{-/-} de ambos os sexos com 20 a 25 g, os quais foram obtidos do Biotério Geral da Universidade de São Paulo (USP) - Campus de Ribeirão Preto e do biotério de animais especiais da FMRP-USP e mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) no dia 20/06/2018 (Protocolo número 18.1.228.60.4).

4.2 Obtenção da peçonha bruta de *Tityus serrulatus*

Os escorpiões *T. serrulatus* foram mantidos no vivário do Biotério Geral do Campus de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. TsV foi extraído do escorpião *T. serrulatus* e estocado a -20 °C. Para determinar a presença de LPS no TsV foi realizado teste de lisado amebócitos *Limulus* (LAL, do inglês *Limulus Amoebocyte Lysate test*) (QCL-1000, BioWhittaker, Cambrex Company, Walkersville, MD, USA). O teste revelou a ausência de endotoxina na amostra.

4.3 Eutanásia

Para a obtenção das células da medula óssea e macrófagos peritoneais, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) eutanasiados com uma overdose de solução de 20% de quetamina e 10% de xilasina.

4.4 Obtenção de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais de camundongos de linhagens C57BL/6 (WT) e CD14^{-/-} foram isolados da cavidade peritoneal de camundongos “naives”. A assepsia da pele foi feita com álcool 70%. Posteriormente, através de um corte cutâneo no abdômen, a pele

do animal foi retirada até exposição do peritônio. Foi injetado 5 mL de RPMI-I na cavidade peritoneal, a qual foi massageada gentilmente, e o lavado peritoneal coletado e centrifugado por 5 min, 200 g, a 25°C. A contagem e viabilidade das células foram determinadas em Azul de Trypan (Gibco Invitrogen, USA) empregando câmara de Neubauer. O número de células foi ajustado para 1×10^6 células/mL. As células foram cultivadas à 37°C, 5% CO₂, em meio RPMI-I (contendo antibiótico e 10% de soro fetal bovino e 2mM de L-glutamina) por 2 h antes do estímulo, em placas de cultura de 48 poços.

4.5 Diferenciação de macrófagos a partir de células da medula óssea (BMDM)

As células precursoras de macrófagos foram obtidas da medula óssea de fêmures e tíbias cuidadosamente removidos de camundongos C57BL/6 e CD14^{-/-}. Os ossos foram seccionados em ambiente estéril e lavados com meio RPMI -I (BioWhittaker®, Lonza, Walkersville, MD, USA) utilizando uma seringa com agulha 13 x 4,5 mm. As células recém colhidas foram cultivadas em meio RPMI 20/30 (RPMI 1640 contendo 20% de soro fetal bovino (GIBCO), 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM), 100 µ/mL de penicilina G potássica (USB), 2 mM de L-glutamina) e distribuídas em placas de Petri de dimensões 100 x 20 mm (Corning Incorporated, USA) em um volume de 10 mL por placa, as quais foram incubadas a 37° C, em atmosfera umidificada contendo 5 % de CO₂. Um total de 10 mL de meio RPMI 20/30 foi adicionado depois de 4 dias de cultivo. Após 7 dias de incubação, os macrófagos foram coletados pela lavagem das monocamadas com PBS gelado. Após a coleta, a contagem e viabilidade das células foram determinadas em Azul de Trypan (Gibco Invitrogen, USA) e o número de células foi ajustado para 1×10^6 células/mL, as quais foram adicionadas em placa de 48 poços, em meio RPMI 10/5 (RPMI 1640 contendo 10 % soro fetal bovino (GIBCO), 5% de meio condicionado de células L929 (LCCM), 100 µ/mL de penicilina G potássica (USB), 2mM de L-glutamina) por 18 h antes dos estímulos.

4.6 Estímulo de macrófagos com TsV ou com LPS

Os macrófagos derivados das linhagens C57BL/6 ou *Cd14^{-/-}*, diferenciados da medula óssea ou obtidos da cavidade peritoneal, foram estimulados com TsV (50 µg/mL) ou LPS (500 ng/mL), e coletados nos tempos 0, 6 e 12 h. Após estes períodos, os

sobrenadantes foram coletados e armazenados à -20°C para quantificação de mediadores lipídicos. As células foram utilizadas para realizar o metabóloma.

4.7 Análise global de metabólitos por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-MS)

Macrófagos peritoneais ou derivados da medula (1×10^6 por poço), foram lavados em PBS gelado, e depois de retirar o sobrenadante foi adicionado 65 μL /poço de acetonitrila/ H_2O (2:1 v/v) para romper a membrana celular e precipitar as proteínas. Padrões químicos comerciais [trimethyl- $^{13}\text{C}_3$]-caffeine e [^{15}N]-L-tyrosine foram adicionados (5 μL de cada) e a mistura foi homogeneizada. Após, a mistura ser centrifugada a 13.000 g por 10 minutos o sobrenadante foi coletado. As amostras foram então submetidas a análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, utilizando o espectrômetro de massas Exactive Plus Orbitrap (Thermo Scientific) acoplado ao sistema de UHPLC Accela (Thermo Scientific) e coluna Ascentis® Express HILIC (2.7 μm , 100 x 2.1 mm). A ionização foi feita com uma fonte de *electrospray* (H-ESI II) e o sistema foi operado no modo positivo e faixa de massa *full scan*. O sistema é controlado pelos programas Xcalibur e Tune (Thermo Scientific). A temperatura do capilar foi 300°C e temperatura do aquecedor 300°C . O método cromatográfico utilizado foi: solvente. A - H_2O + 0.1% AF; solvente. B - ACN + 0.1% AF. 0 - 2 min. 5 % A; 2 - 10 min. Gradiente linear a 30% A; 10 - 11 min. Gradiente linear a 90% A; 11 - 12min. 90% solvente. A; 12 - 12.5min. gradiente linear a 5% sol. A; 12.5 – 16 min. 5% solvente A. O fluxo foi 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ e o volume de injeção 10 μL .

Os dados obtidos pelo sistema de LC-MS foram primeiramente convertidos no formato mzXML utilizando o programa ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net/#>). Em seguida, a detecção dos picos da razão massa/carga (m/z), a remoção de ruídos, o alinhamento de m/z e o tempo de retenção das amostras e a quantificação dos compostos foram realizados utilizando a linguagem computacional R e o pacote apLCMS conforme descrito previamente (GARDINASSI et al., 2017). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste *t* moderado utilizando o pacote para o R *limma*. O enriquecimento de metabólitos em vias e redes metabólicas foi feito pelo programa *mummichog* utilizando a linguagem computacional *python*.

4.8 Quantificação de mediadores lipídicos

Após os estímulos com TsV ou LPS os sobrenadantes das culturas celulares foram

coletados para extração de lipídeos. Em seguida, foi adicionado nas amostras, uma solução de padrões internos deuterados, em concentrações conhecidas. Para determinação das concentrações dos eicosanóides presentes nas amostras, curvas padrões foram determinadas utilizando padrões moleculares de analitos (Cayman Chemical Co Ann Arbor, MI, EUA). Os lipídios das amostras foram extraídos em colunas HyperSep C18 (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN, EUA) como previamente descrito pelo nosso grupo (SORGI et al., 2017). A fração lipídica retida na coluna foi eluída com metanol grau HPLC (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e o eluato foi seco em *speed vacuum* e reconstituído em 50 µL de metanol/água (7:3). Para identificação e quantificação dos mediadores lipídicos, foi utilizado o método de HPLC- MS/MS Nexera-TripleTOF® 5600+ (SORGI et al., 2017) do Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios – (CEQIL) coordenado pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli. O processamento dos dados foi realizado pelos programas PeakView 2.1 e MultiQuant 3.0 (AB Sciex, Foster, CA, EUA) (SORGI et al., 2017).

Tabela 1: Padrões analíticos empregados para a identificação e quantificação de mediadores lipídicos.

Padrões	Tempo de retenção	Concentração (ng/mL)
TXB2-d4	4.06	500
6-keto-PG1 α -d4	4.45	500
PGE-d4	5.20	500
PGD-d4	5.56	500
15-deoxi-PGJ2-d4	13.23	500
PGF2 α -d4	4.63	500
5-HETE-d8	14.41	500
12-HETE-d8	14.22	500
RVD1-d5	6.21	500
15-HETE-d8	13.89	500
5-oxo-ETE-d7	14.68	500
LTC4-d5	5.09	500
AA-d8	17.17	500
12-epi-LTB4-d4	10.54	500
LXA4-d5	5.93	500
11,12 EET-d11		

LTE4-d5	12.94	500
	7.90	500

4.9 Análises estatísticas.

As análises dos dados foram realizadas com pacotes estabelecidos para R e GraphPad Prism v 6.0 e. Os testes Student's t-test ou ANOVA seguido do teste Tukey foram usados para avaliar as diferenças entre grupos independentes. Valores de P menor que 0,05 foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização dos métodos para obtenção e ativação de macrófagos peritoneais (MPs) e diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6

A Figura 1 mostra que, as células foram responsivas ao estímulo com LPS, e produziram quantidades de óxido nítrico variando de 16 a 35 μM , sendo estes valores semelhantes aos descritos na literatura (ARANCIBIA et al., 2016; MACECKOVA et al., 2015). Gostaríamos de ressaltar que MPs produziram 45% menos óxido nítrico do que BMDM.

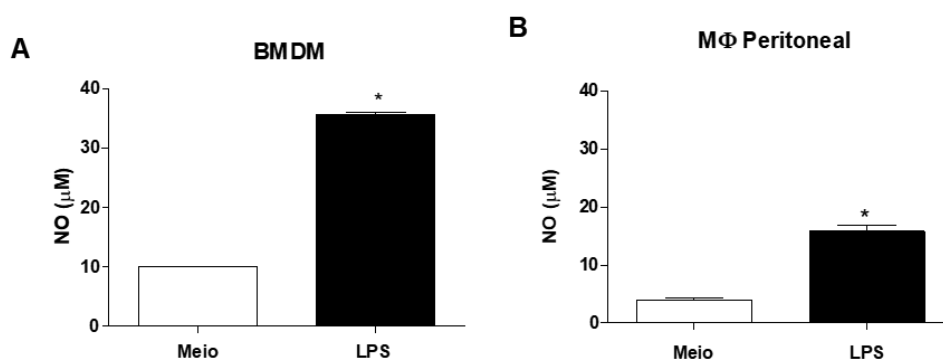


Figura 1. Estímulo com LPS por 24 horas induziu a liberação de óxido por BMDMs ou MPs. As células derivadas de medula óssea foram cultivadas em meio RPMI 20/30 durante 7 dias, em 5% de CO_2 , temperatura de 37°C , para obtenção dos macrófagos (BMDMs). Macrófagos peritoneais (MPs) foram obtidos por meio de lavagem da cavidade peritoneal utilizando 3 mL de RPMI-I. Ambos tipos de células foram obtidos de camundongos C57BL/6 (WT) *naive*. Após contagem das células em câmara de Neubauer, estas foram semeadas (1×10^6 células/poço) em placas de 48 poços em RPMI-I para MPs ou em RPMI 10/5 para BMDMs, e após 2 ou 18 horas respectivamente, em 5% de CO_2 , temperatura de 37°C , as não aderentes foram retiradas por lavagem com RPMI-I. As células aderidas foram estimuladas ou não com LPS (500 ng/mL) durante 24 horas, em 5% de CO_2 , temperatura de 37°C , para posterior quantificação de óxido nítrico (A-B) nos sobrenadantes, empregando método de Greiss. Em cada condição experimental foram utilizados $n = 3$ poços. Os dados representam média e desvios padrões e foram analisados pelo teste t de Student, sendo $p < 0.05$ considerado significativo.

5.2 Alterações metabólicas induzidas por TsV ou LPS em BMDMs obtidos de animais C57BL/6 ou $\text{CD14}^{-/-}$

Feita a padronização da obtenção dos subtipos de macrófagos, realizamos os experimentos para determinar o perfil metabólico destas células após os diferentes estímulos (TsV ou LPS), assim como na presença ou ausência de CD14.

A plataforma de metabolômica sem alvo definido utilizada neste estudo detectou mais de 10.000 compostos ionizados (picos de m/z ou metabólitos). Após transformação dos dados para escala logarítmica e filtragem de valores ausentes, 7272 compostos ionizados foram utilizados em análises posteriores. As comparações entre a intensidade

destes compostos detectados em BMDMs de camundongos C57BL/6 ou de CD14^{-/-}, cultivadas somente com meio RPMI-I (0 h), revelaram diferenças no perfil metabólico destas células, visto que as análises estatísticas resultaram em diferenças significativas na abundância de diversos metabólitos. Ainda, ressaltamos maior número de metabólitos regulados negativamente (pontos azuis) em relação aos metabólitos regulados positivamente (pontos vermelhos), sugerindo que a ausência do CD14 altera o metabolismo basal dos BMDMs (Figura 2A).

Para entender a resposta metabólica a cada tipo de estímulo (TsV ou LPS) e como a ausência de CD14 influencia neste processo, nós comparamos BMDMs estimulados durante 6 e 12 h com os respectivos controles de cada genótipo (0 h). Nós observamos que em células de ambas as linhagens de animais, o número de metabólitos regulados positivamente (coluna vermelha) excedeu o número de metabólitos regulados negativamente (coluna azul) após 6 horas de estímulo com TsV (Figura 3B). Entretanto, após 12 horas com o mesmo estímulo, observamos diminuição nas alterações, e inversão no perfil metabólico, com maior número de metabólitos regulados negativamente. Quando analisamos as alterações metabólicas dos BMDMs das duas linhagens de animais, induzidas pelo LPS em 6 e 12 horas, observamos um perfil diferente daquele encontrado com TsV (Figura 3B). Após 6 h de estímulo, BMDMs WT apresentaram um número maior de metabólitos regulados positivamente quando comparados aos regulados negativamente. No mesmo período de estímulo, a deficiência de CD14 induziu maior número de alterações tanto de metabólitos regulados positivamente quanto negativamente, porém observamos uma inversão deste perfil em relação a BMDMs WT visto que o número de metabólitos regulados negativamente foi maior em BMDMs *Cd14*^{-/-}. Após 12 h de estímulo com LPS, ambas as linhagens de BMDMs apresentaram predominância de metabólitos regulados negativamente, porém BMDMs *Cd14*^{-/-} apresentaram número maior de metabólitos regulados negativamente e menor de metabólitos regulados positivamente (Figura 2B). Estes resultados mostram claramente que o TsV e o LPS impactam o metabolismo de BMDMs WT, cuja regulação depende da natureza e do tempo de estímulo. Ainda, observamos que a ausência do CD14 modifica o perfil da resposta metabólica de BMDMs estimulados com TsV ou com LPS.

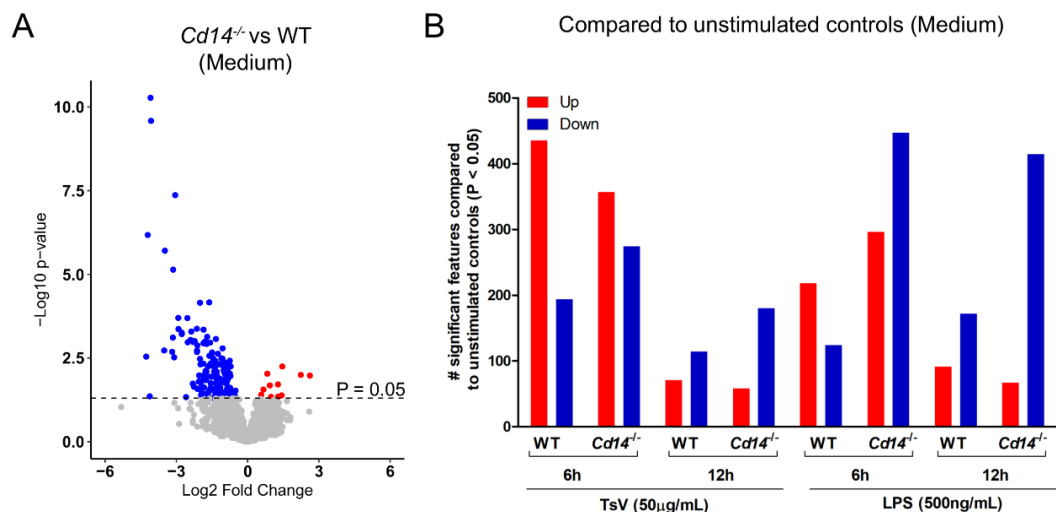


Figura 2: TsV, LPS e a ausência do receptor CD14 induzem diferenças nos compostos ionizados. (A) Abundância diferencial de compostos ionizados (metabólitos) em BMDMs WT *versus* CD14^{-/-} cultivados com veículo (não estimulados). (B) Diferença das características metabólicas entre as duas linhagens celulares após os estímulos com TsV ou com LPS em relação ao respectivo controle (células cultivadas somente com meio). Metabólitos significativos foram identificados por t teste moderado e a significância foi estabelecida em $p < 0.05$.

5.3 Dinâmica da resposta metabólica de BMDMs estimulados com TsV ou com LPS

Para entendermos a dinâmica da resposta metabólica de BMDMs, e quais as semelhanças e diferenças induzidas pelos dois diferentes estímulos, avaliamos a abundância diferencial de BMDMs WT estimulados com TsV ou com LPS. Nós observamos que o estímulo por LPS resultou na abundância diferencial de 624 metabólitos, comparados a 520 metabólitos diferencialmente abundantes após estímulo com TsV (Figura 3A). Após 6 h de estímulo com TsV, diversos metabólitos apresentaram modulação da abundância em relação àquela observada nos controles, mas após 12 horas o perfil metabólico mais semelhante aos controles, sugerindo um retorno ao metabolismo basal. A estimulação com LPS também alterou o perfil metabólico das células após 6 horas, mas diferentemente do TsV, após 12 horas as células não retornaram ao metabolismo inicial, pois continuaram a apresentar diferenças na abundância de diversos metabólitos, quando comparados ao estímulo por 6 h ou controles (Figura 3A). A análise de vias metabólicas por meio da ferramenta de bioinformática *mumichog* (LI et al., 2013) revelou que as alterações induzidas por TsV estão relacionadas com as vias de pentose fosfato, metabolismo de drogas, aminoácidos e vitaminas, assim como colesterol (Figura 3B). O LPS induziu alterações principalmente em vias relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos e vitaminas (Figura 3B).

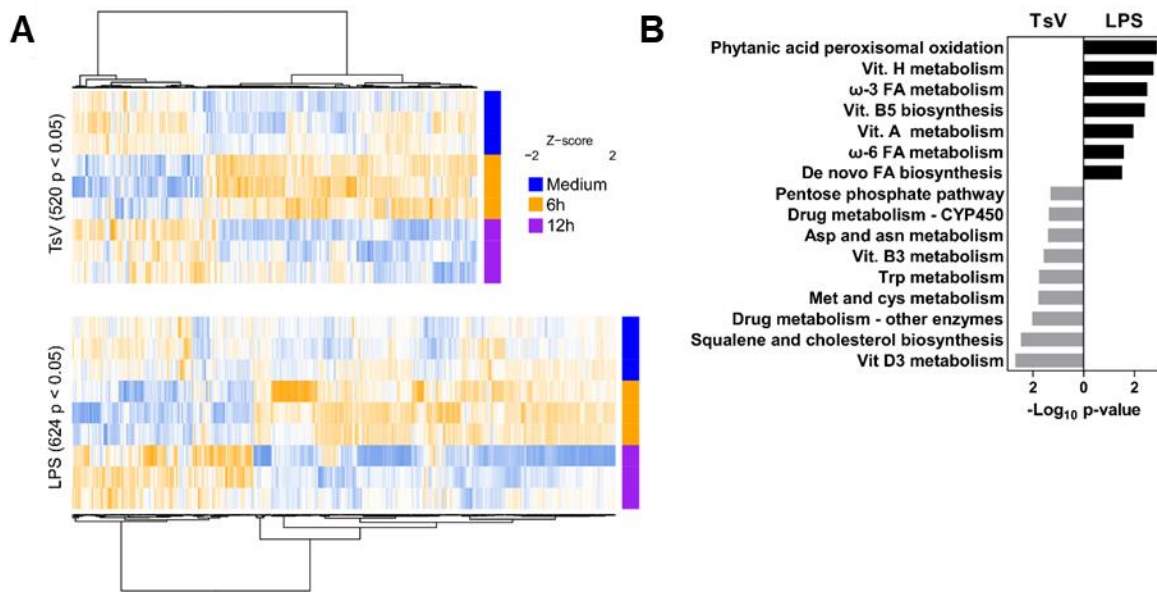


Figura 3: Dinâmica da abundância diferencial de metabólitos após estímulo de BMDMs com TsV ou LPS. (A) Resposta longitudinal da abundância diferencial de compostos ionizados ao decorrer do tempo de estímulo de BMDMs C57BL/6 (WT) com TsV ou LPS; (B) Predição da atividade de vias metabólicas enriquecidas pelos metabólitos diferencialmente abundantes de acordo com o estímulo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando ANOVA e a significância foi estabelecida em $p < 0.05$.

5.4 A ausência de CD14 altera o perfil metabólico de BMDMs estimulados com TsV ou LPS

Ao comparar a abundância dos mesmos metabólitos entre BMDM WT e *Cd14*^{-/-} após 6 h de estímulo com TsV, notamos a presença de um grupo de metabólitos regulados positivamente com significância elevada (Figura 4A), que não permanece aparente após 12 h de estímulo (Figura 4B). Já, o estímulo com LPS induziu predominância de metabólitos regulados negativamente após 6 h (Figura 4C), cujo perfil também foi diferente após 12 h de estímulo (Figura 4D).

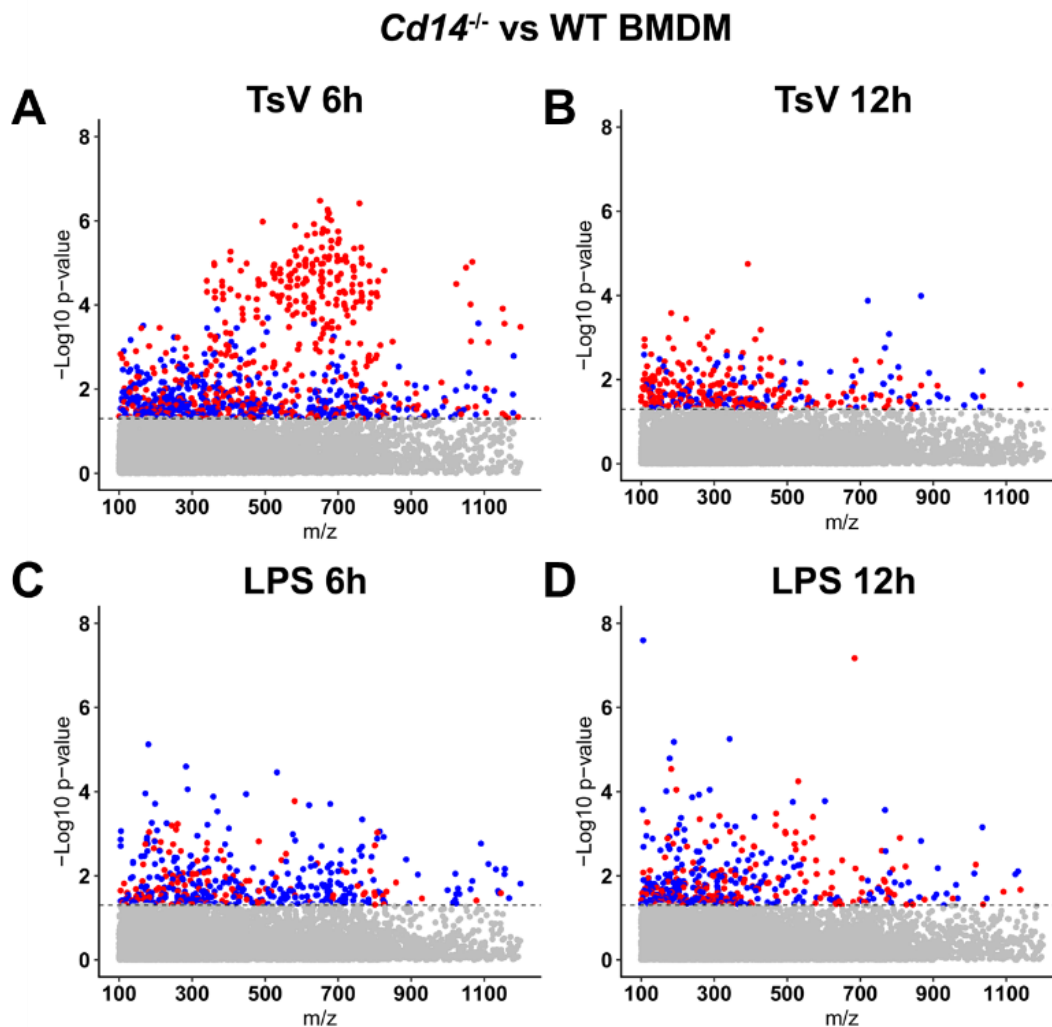


Figura 4. (A-D) Gráfico de Manhattan representando metabólitos diferencialmente abundantes em BMDMs das linhagens C57BL/6 *versus* *Cd14^{-/-}*, de acordo com o tempo de estímulo. As cores azul ou vermelho dos pontos reflete a regulação negativa ou positiva, respectivamente. Os metabólitos demonstrados acima da linha tracejada são considerados significativos ($p < 0.05$). Metabólitos significativos foram identificados por t teste moderado e a significância foi estabelecida em $p < 0.05$.

A sobreposição do número de metabólitos diferencialmente abundantes entre BMDMs WT e *Cd14^{-/-}* demonstra que estas alterações dependem da natureza (TsV ou LPS) e tempo de estímulo (6 ou 12 h), visto que apenas 10 metabólitos diferencialmente abundantes foram compartilhados em todas as comparações (Figura 5A). De fato, observa-se que grande parte dos metabólitos diferencialmente abundantes foram especificamente modulados dependendo do estímulo e tempo, sendo que o estímulo com TsV por 6 h apresentou o maior número de metabólitos especificamente modulados (Figura 5A). Apesar disso, a análise de vias metabólicas revelou associação com poucas vias conhecidas, como metabolismo de hormônios esteroides, porfirina, vitamina D3 e biossíntese de

colesterol (Figura 5B). Já no decorrer de 12 horas de estímulo com TsV, a ausência de CD14 foi associada com alterações no metabolismo de alguns aminoácidos, metabolismo de drogas, metabolismo de glutatona (GSH) e da vitamina B3 (Figura 5B). Esses dados sugerem que a maioria dos metabólitos encontrados no período inicial com estímulo podem ser originados do próprio veneno e não produzidos pelas células. Ainda, observamos que CD14 regula diversas vias metabólicas que foram alteradas, independente do estímulo com TsV ou LPS, que incluem metabolismo de Arg e Pro, Asp e Asn, Met e Cys, Trp, Tyr, metabolismo de butanoato e o de drogas via CYP450 (Figura 5B). Esses dados sugerem papel crítico de CD14 na atividade destas vias metabólicas em BMDMs.

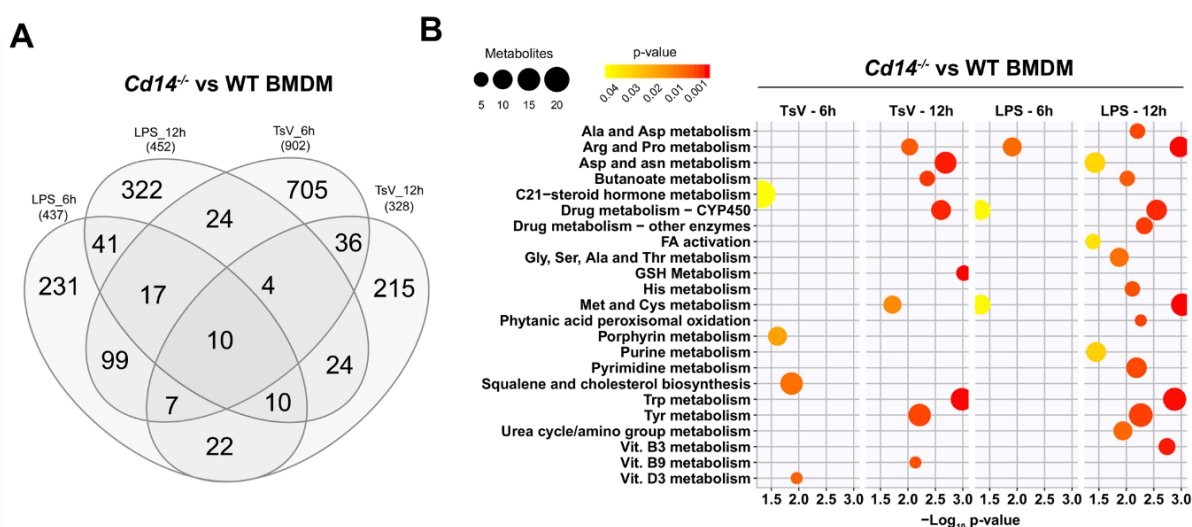


Figura 5. Estímulos com LPS ou TsV desencadeiam mudanças diferentes no perfil metabólico de BMDMs quando comparado CD14^{-/-} com C57BL/6 (WT). (A) Diagrama de Venn para avaliar sobreposição de metabólitos diferencialmente abundantes; (B) Análises funcionais e predição da atividade de vias metabólicas. Metabolitos significativos foram identificados por *t test* moderado com o pacote *limma* para linguagem computacional R.

5.5 Alterações metabólicas induzidas por TsV ou LPS em MPs obtidos de animais C57BL/6 ou CD14^{-/-}

Utilizamos o mesmo método analítico de metabolômica para desvendar quais mudanças ocorrem no metabolismo dos MPs após os estímulos com TsV ou LPS, e se a ausência da molécula CD14 influencia em tais mudanças. Para tal objetivo, utilizamos MPs de animais C57BL/6 ou de CD14^{-/-}. As células foram estimuladas ou não com TsV 50

$\mu\text{g/mL}$ ou LPS 500 ng/mL , e nos tempos 0, 6 e 12 horas os metabolitos foram extraídos com acetonitrila e água para então serem analisados via LC-MS.

A análise de LC-MS destas amostras detectou mais de 9.000 compostos ionizados (picos de m/z ou metabólitos). Após transformação dos dados para escala logarítmica e filtragem de valores ausentes, 6496 compostos ionizados foram utilizados em análises posteriores. Assim como BMDMs, MPs de camundongos C57BL/6 ou de $\text{CD14}^{-/-}$ cultivadas somente com meio RPMI-I apresentaram diferenças significativas no perfil de metabólitos intracelulares. Verificamos que 402 compostos ionizados apresentaram diferenças na abundância entre estas células, sendo 213 regulados positivamente (pontos vermelhos) e 189 regulados negativamente (pontos azuis) (Figura 6A).

A comparação entre MPs dos dois genótipos, com diferentes estímulos e período em relação a seus respectivos controles (MPs não estimulados) está demonstrada na Figura 6B. Observamos que em células de ambas as linhagens de animais, o número de metabólitos regulados positivamente (coluna vermelha) ultrapassa o número de metabólitos regulados negativamente (coluna azul) em todos os tempos e estímulos, enfatizando que esse perfil foi intensificado principalmente nas células de linhagem WT estimuladas com TsV durante 6 horas. De fato, o número de metabólitos modulados em células de ambos os genótipos foi bastante similar, independentemente do estímulo e tempo (Figura 6B). No entanto, isso não significa que as alterações metabólicas observadas são iguais entre os genótipos, estímulos e período de incubação.

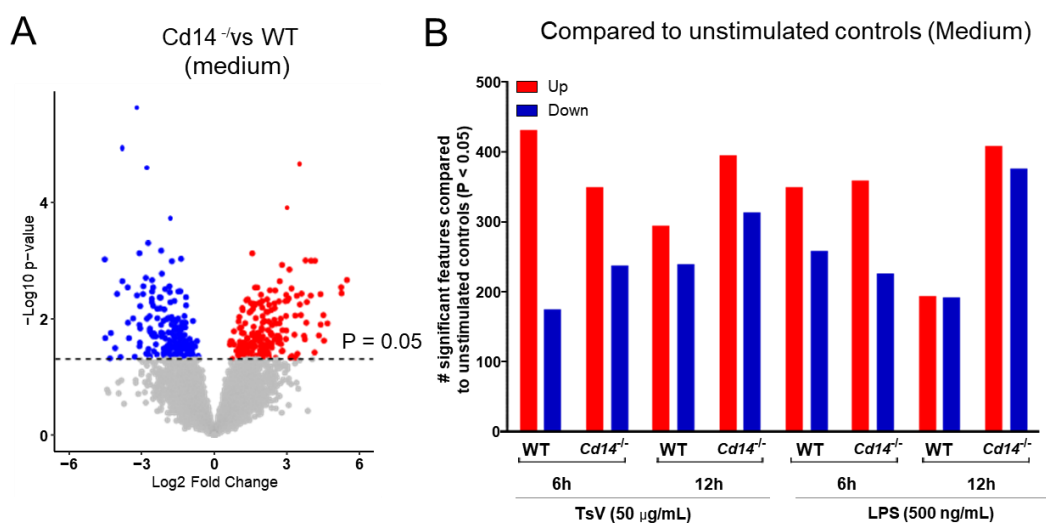


Figura 6: Diferenças nos compostos ionizados induzidas por TsV, LPS e ausência do receptor CD14. (A) Abundância diferencial de compostos ionizados (metabólitos) em MPs WT *versus* $\text{CD14}^{-/-}$ não estimulados (meio somente); (B) Diferença das características metabólicas entre as

duas linhagens celulares após os estímulos com TsV ou LPS em relação ao controle não estimulado (meio somente). Metabólitos significativos foram identificados por t teste moderado e a significância foi estabelecida em $p < 0.05$.

5.6 Dinâmica da resposta metabólica de MPs estimulados com TsV e LPS

A análise da resposta metabólica de MPs WT ao longo do tempo revelou 492 metabólitos diferencialmente abundantes após estímulo com TsV e 636 após estímulo com LPS (Figura 7A). O agrupamento hierárquico destes metabólitos diferencialmente abundantes demonstrou que ambos os estímulos induziram alterações significativas após 6 h (Figura 7A). Após 12 h, TsV induziu alterações de alguns clusters de metabólitos que foram distintas tanto dos tempos 0h e 6h, porém a abundância da maioria dos metabólitos teve maior similaridade com a abundância nas células não estimuladas (0h) em ambos os estímulos (Figura 7A). A análise de vias metabólicas por meio da ferramenta de bioinformática *mumichog* (LI et al., 2013) revelou que as alterações induzidas por TsV estão relacionadas com a fosforilação de hexose, com o metabolismo da vitamina B3, de aminoácidos, ácidos graxos e PIP. Assim como o TsV, o LPS induziu alterações em vias relacionadas a aminoácidos, vitamina B3 e PIP, ademais esse estímulo também influenciou no metabolismo de drogas, purinas e pirimidinas (Figura 7B).

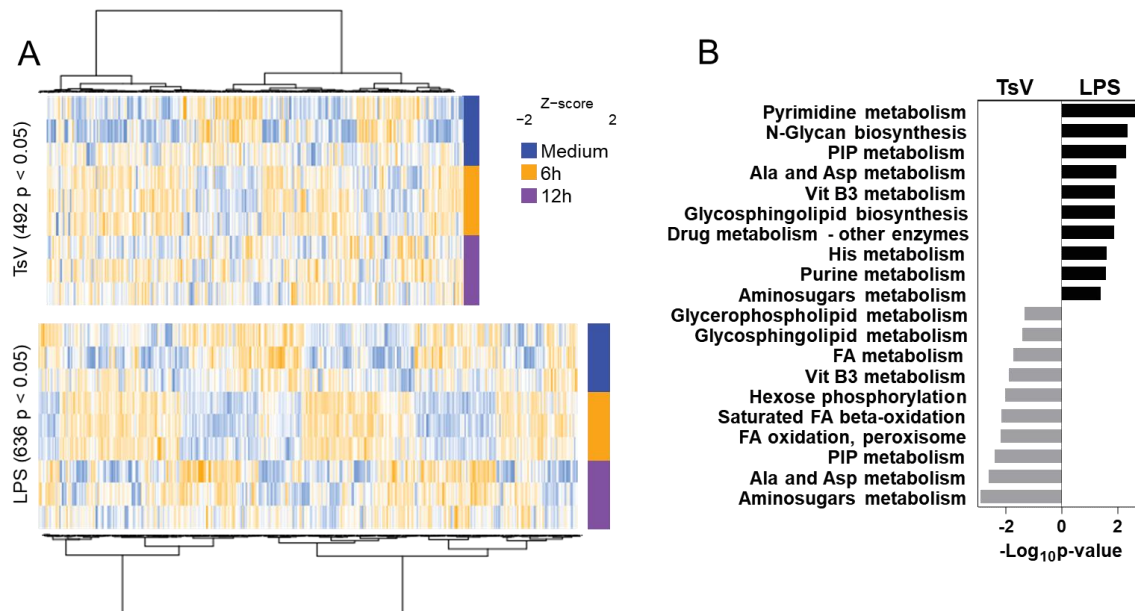


Figura 7: Diferenças entre metabólitos produzidos por MPs de animais C57BL/6 após estímulos com TsV ou LPS. (A) Visualização por heat map dos compostos ionizados ao decorrer do tempo de estímulo de MPs C57BL/6 (WT) com TsV ou LPS; (B) Predição da atividade de vias metabólicas enriquecidas pelos metabólitos diferencialmente abundantes de acordo com o estímulo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando one-way ANOVA.

5.7 A ausência de CD14 altera o perfil metabólico de MPs estimulados com TsV e LPS

Ao comparar a abundância dos metabólitos entre MPs WT e *Cd14*^{-/-} após estímulo com TsV, verificamos 130 e 165 metabólitos regulados positivamente, assim como 145 e 146 regulados negativamente após estímulo com TsV por 6 h e 12 h, respectivamente (Figura 8A – B). Já o número de metabólitos diferencialmente abundantes após estímulo com LPS foi de 173 e metabólitos regulados positivamente, assim como 446 e 448 regulados negativamente após 6 h e 12 h, respectivamente (Figura 8C – D). Estes dados indicam que a ausência de CD14 afeta principalmente a resposta metabólica de MPs após 12 h de estímulo com LPS.

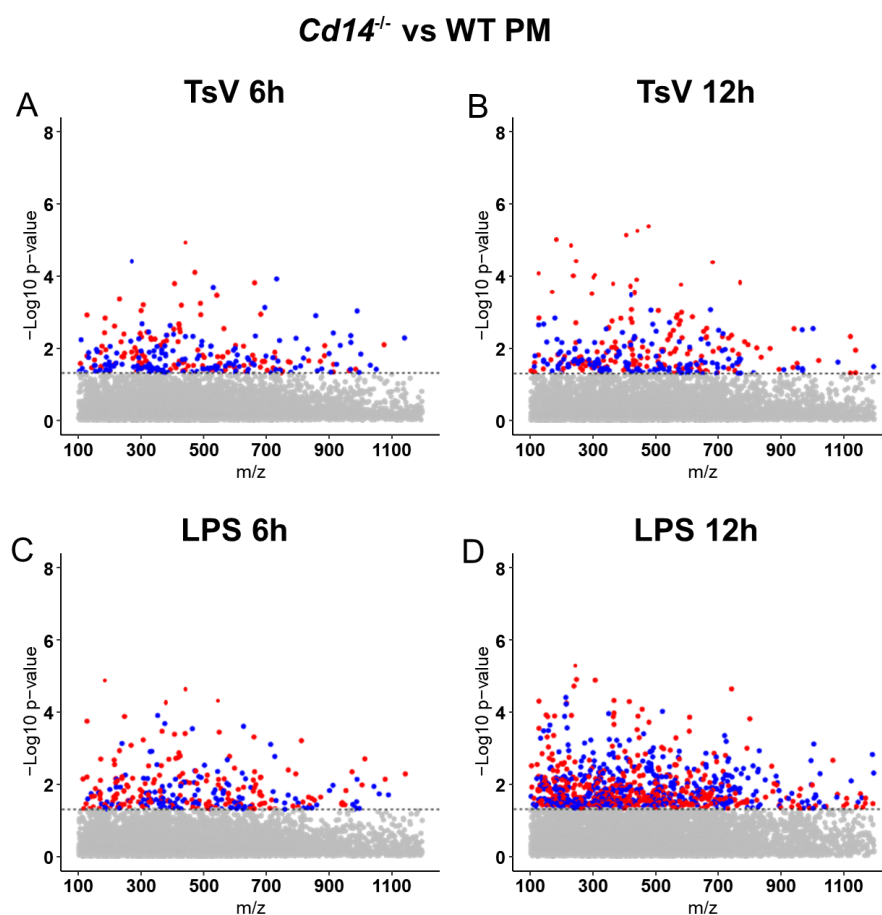


Figura 8. (A-D) Gráfico de Manhattan representando metabólitos diferencialmente abundantes em MPs da linhagem selvagem (C57BL/6) e deficiente de CD14 (*CD14*^{-/-}), de acordo com o tempo e estímulo. A variação de cor de azul para vermelho reflete a regulação negativa para positiva, respectivamente. Os metabólitos demonstrados acima da linha tracejada são considerados significativos ($p < 0.05$). Metabólitos significativos foram identificados por t teste moderado e a significância foi estabelecida em $p < 0.05$.

A sobreposição de metabólitos diferencialmente abundantes após estímulo com LPS ou TsV está demonstrada em um diagrama de Venn (Figura 9A). Esta análise demonstrou que a modulação de metabólitos em MPs WT e *Cd14*^{-/-} dependem do estímulo e período de incubação, visto que apenas 19 metabólitos foram diferencialmente abundantes em todas as comparações (Figura 9A). A análise de vias demonstrou que após 6 h de estímulo, o TsV influenciou o metabolismo de butanoato e na degradação dos aminoácidos Val, Leu e Ile. (Figura 9B). Já no decorrer de 12 h, a ausência de CD14 também alterou o metabolismo de alguns aminoácidos, fosfolipídeos e da vitamina B3. Ainda, observamos que após estímulo com LPS, CD14 regula vias relacionadas ao metabolismo de drogas, gliconeogênese, metabolismo de purinas e pirimidinas. Também foram observadas vias metabólicas comumente alteradas, independente do estímulo com TsV ou LPS, que incluem metabolismo de Asp e Asn, Met e Cys, metabolismo de glicerolfosfolipídeo e vitamina B9 (Figura 9B). Esses dados sugerem papel crítico de CD14 na atividade destas vias metabólicas.

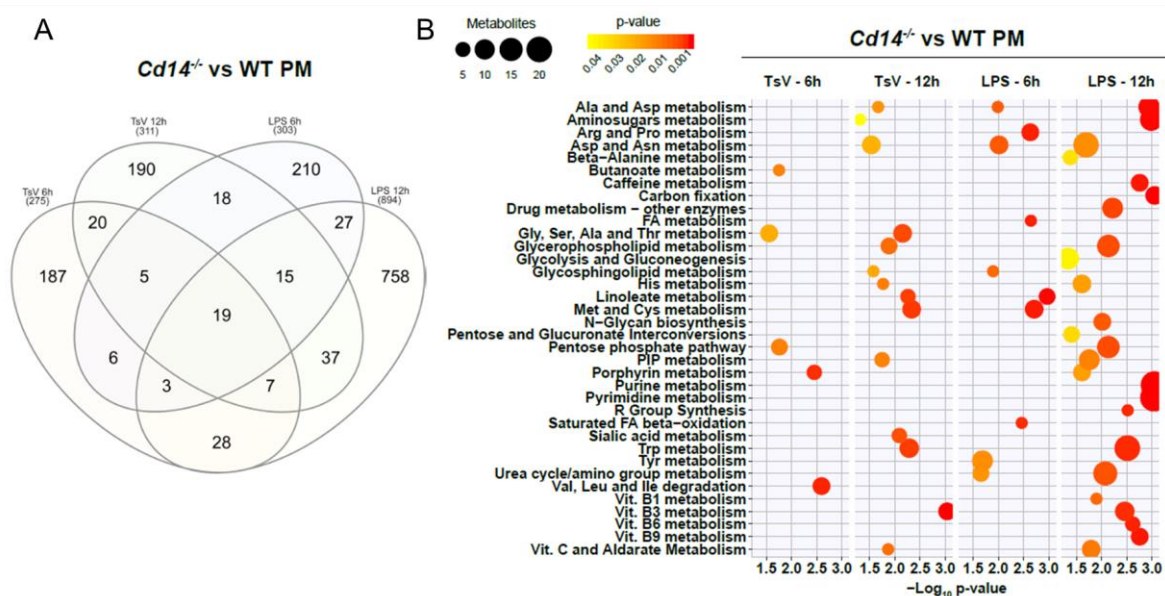


Figura 9. Estímulos com LPS ou TsV desencadeiam diferentes mudanças no perfil metabólico de MPs *CD14*^{-/-} em relação aos C57BL/6 (WT). (A) Diagrama de Venn para avaliar sobreposição de metabólitos diferencialmente abundantes; (B) Análises funcionais e predição da atividade de vias metabólicas. Metabolitos significativos foram identificados por *t test* moderado com o pacote *limma* para linguagem computacional R.

5.4. Produção de eicosanoides após estímulos com TsV ou LPS em BMDMs obtidos de animais C57BL/6 ou CD14^{-/-}

Para validar os resultados obtidos através da análise de metaboloma, utilizamos a via do metabolismo de ácido graxo para verificar se a produção de mediadores lipídicos foi influenciada pela ausência da molécula CD14 utilizando a técnica HPLC-MS/MS. A produção de PGE₂, TXB₂ e PGD₂ por BMDMs após estímulo com LPS foi tempo dependente, ademais, a produção destes mesmo mediadores e de 11-HETE e PGF_{2a} foi maior nas células de linhagem selvagem comparado com as células deficientes da molécula CD14 (Fig. A-E). Entretanto TsV influenciou somente na produção de TXB₂ e PGD₂, porém não teve diferença entre as linhagens celulares (Fig. F-J).

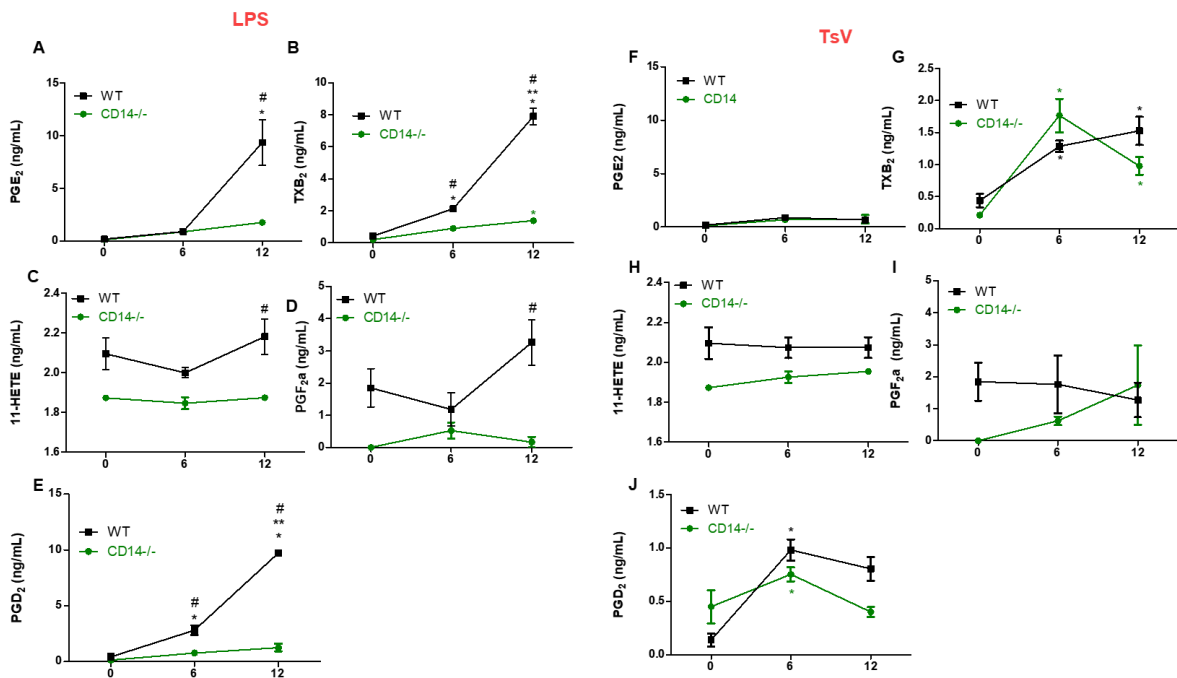


Figura 10: CD14 controla a produção de mediadores lipídicos em BMDMs. BMDMs das linhagens C57BL/6 e CD14^{-/-} (1x10⁶ células/ poço) foram estimulados com LPS (500 ng/mL) (A-E) ou TsV (50 µg/mL) (F-J) durante 6 e 12 horas em placas de cultura de 48 poços. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para extração de lipídios. Após extração dos lipídios, estes foram analisados e quantificados empregando HPLC-MS/MS. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando one-way ANOVA seguido por Tukey. A significância estatística foi determinada como $p < 0.05$. *Estimulado *versus* RPMI; #WT *versus* CD14^{-/-} Os dados das figuras representam médias \pm EPM.

5.5 Produção de eicosanoides por MPs obtidos de animais C57BL/6 ou CD14^{-/-} após estímulos com TsV ou LPS

A mesma técnica de HPLC-MS/MS foi utilizada para avaliar a produção de eicosanoides por MPs estimulados com LPS ou TsV. Após estímulo com LPS, os lipídios PGE₂, TXB₂ e PGD₂ tiveram sua produção aumentada quando comparados com as células não estimuladas (somente meio), sendo que somente a produção de PGD₂ foi dependente de CD14. TsV induziu somente a aumento significativo na produção de PGE₂ e PGD₂ pelas células WT.

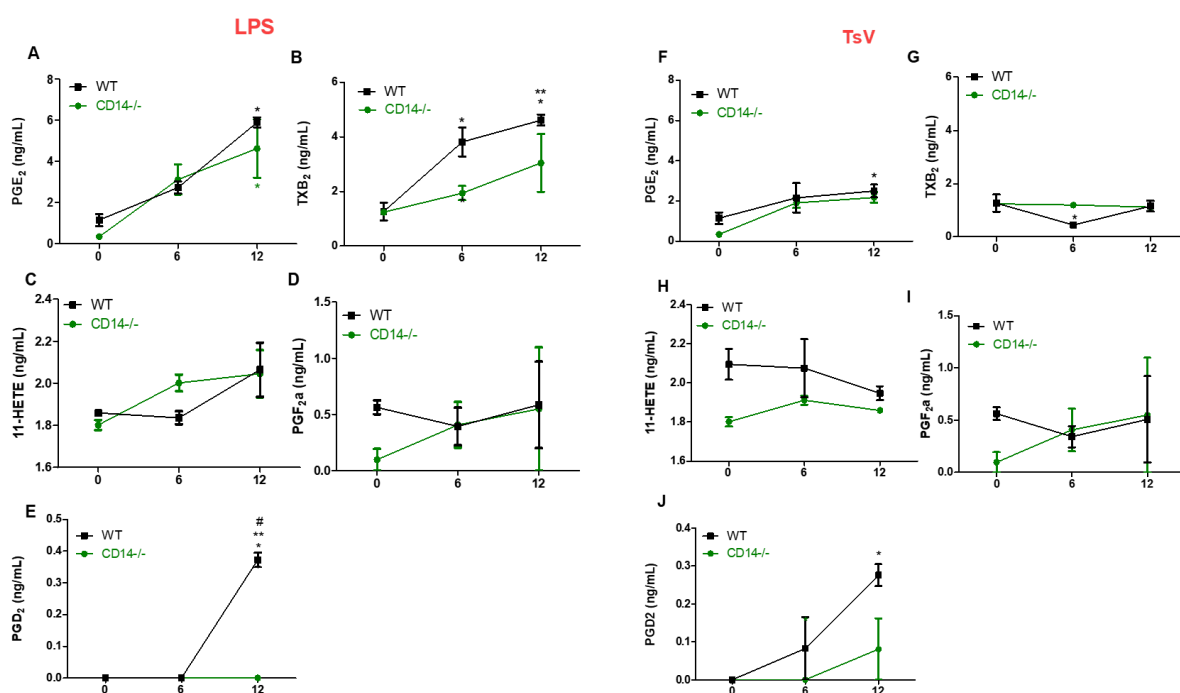


Figura 11: A produção de prostanoídeos é parcialmente regulada por CD14 em MPs. MPs das linhagens C57BL/6 e CD14^{-/-} (1×10^6 células/ poço) foram estimulados com LPS (500 ng/mL) (A-E) ou TsV (50 μ g/mL) (F-J) durante 6 e 12 horas em placas de cultura de 48 poços. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados para extração de lipídeos. Após extração dos lipídeos, estes foram analisados e quantificados empregando HPLC-MS/MS. As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando one-way ANOVA seguido por Tukey. A significância estatística foi determinada como $p < 0.05$. *Estimulado *versus* RPMI; #WT *versus* CD14^{-/-}. Os dados das figuras representam médias \pm EPM.

5.6 Produção de IL-1 β por BMDMs de animais C57BL/6 (WT) e CD14^{-/-} estimulados *in vitro* com TsV ou LPS

Também quantificamos a produção de IL-1 β no sobrenadante da cultura de BMDMs utilizando kit comercial de ELISA, segundo instruções do fabricante (Figura 12). Os resultados demonstraram que após o estímulo com LPS 500 ng/mL houve aumento significativo da citocina IL-1 β , porém nenhuma diferença foi observada, se

comparadas as células WT e CD14^{-/-} (Figura 12B). A produção da mesma citocina após estímulo com TsV seguiu um padrão semelhante, porém, as células CD14^{-/-} liberaram significativamente mais esta citocina (Figura 12A).

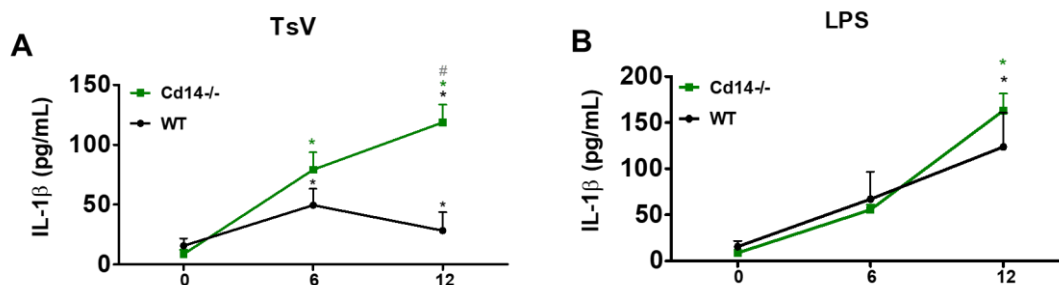


Figura 12. TsV ou LPS induzem a produção IL-1β por BMDMs C57BL/6 (WT) e CD14^{-/-}. A quantificação de IL-1β após estimulação com TsV (A) ou LPS (B) foi realizada utilizando ELISA (n = 3 poços). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando one-way ANOVA seguido por Tukey. A significância estatística foi determinada como $p < 0.05$. Os dados das figuras representam médias ± EPM.

5.7 Produção de IL-1β por MPs de animais C57BL/6 (WT) e CD14^{-/-} estimulados *in vitro* com TsV ou LPS

A produção de IL-1β também foi avaliada em MPs utilizando kit comercial de ELISA, segundo instruções do fabricante (Figura 13). Semelhante aos resultados obtidos com BMDMs, os MPs também apresentaram um aumento significativo desta citocina após o estímulo com LPS 500 ng/mL, entretanto as células WT tiveram maior produção de IL-1 β quando comparado com as deficientes da molécula CD14. (Figura 13B). Após estímulo com TsV, somente os MPs CD14^{-/-} liberaram significativamente mais esta citocina (Figura 12A).

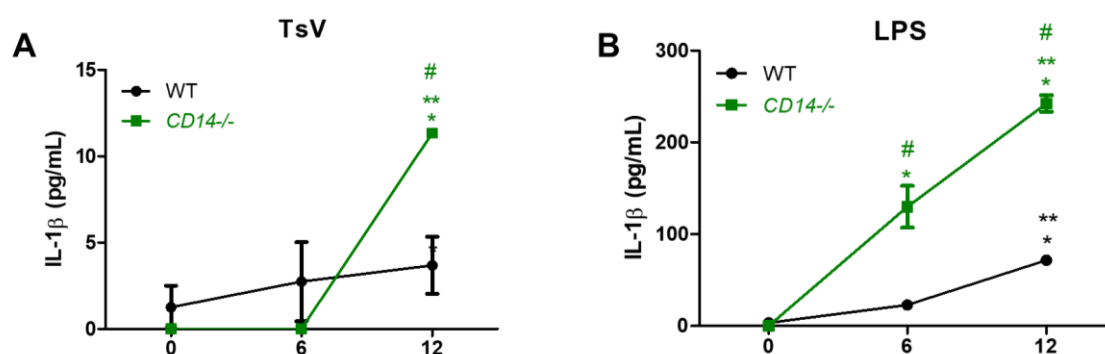


Figura 13. A ausência de CD14 não prejudicou a produção IL-1β por MPs estimulados com LPS ou TsV. A quantificação de IL-1β após estimulação com TsV (A) ou LPS (B) foi realizada utilizando ELISA (n = 3 poços). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas usando one-way ANOVA seguido por Tukey ou *t* teste de Student. A significância estatística foi determinada como $p < 0.05$. Os dados das figuras representam médias ± EPM.

6. DISCUSSÃO

Os macrófagos têm diversas funções na homeostase e na inflamação. Estudos demonstram que as características metabólicas dessas células regulam sua função, incluindo a liberação de citocinas e a expressão de receptores de superfície responsáveis pelo reconhecimento de DAMPs, VAMPs e PAMPs, que são fundamentais para o início da resposta imune inata e para o controle de agentes agressores, além da preservação da integridade do hospedeiro (KUMAR et al., 2011; KOLLI et al., 2013, ZOCCAL et al., 2018). A molécula CD14 é muito bem descrita no reconhecimento do LPS, fato que desencadeia resposta imune (HAILMAN et al., 1994; WRIGHT, 1995). Sabe-se que esta molécula atua principalmente como co-receptor de TLR4 (CHOW et al., 1999; POLTORAK et al., 1998), embora também auxilie na ativação mediada por outros TLRs (BAUMANN et al., 2010; LEE et al., 2006; RABY et al., 2013). Recentemente foi descrito que o CD14 também reconhece a peçonha de escorpião e regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores lipídicos (ZOCCAL et al., 2014, 2018). No entanto, alterações metabólicas induzidas por TsV e a influência do CD14 neste contexto são escassos.

A ativação de PRRs, por exemplo de TLRs, é um dos eventos mais comuns que desencadeiam a reprogramação metabólica de macrófagos que mudam seu metabolismo de acordo com o estímulo recebido, sendo que essas adaptações metabólicas direcionam funções efetoras específicas (BRUBAKER; BONHAM; ZANONI; KAGAN, 2015). A ativação do sistema imune é acompanhada por alterações substanciais nas atividades celulares, que incluem a produção de mediadores inflamatórios como citocinas. Para induzir e manter a resposta inflamatória é necessária alta demanda energética, e neste caso a regulação do metabolismo celular é direcionada para a síntese de ATP (PEARCE; EVERTS, 2014). Nesse contexto, as mudanças metabólicas ocorrem principalmente para manter o equilíbrio da oferta e demanda energética. Em tecidos como coração e músculo esquelético, com alta demanda de ATP, a produção de energia é realmente a principal função das vias metabólicas. Contudo, a reprogramação metabólica também inclui a regulação da síntese de lipídios, biossíntese de nucleotídeos, sinalização celular e expressão gênica, fatos de grande importância na resposta imune (FEI; LEE; MCCARRY; BOWDISH, 2016). Em particular, a capacidade de produção de metabólitos específicos ou eventos de sinalização metabólica para regular a diferenciação celular e a

função efetora estão sendo cada vez mais estudadas dentro da imunologia (LOFTUS; FINLAY, 2015; LAMPROPOULOU et al., 2016).

Iniciamos este trabalho com a padronização para obtenção e ativação de BMDMs e MPs de animais selvagens (WT, C57BL/6). Após estímulo com LPS avaliamos a produção de NO por essas células, e observamos que apesar dos dois tipos celulares produzirem esse mediador inflamatório, a produção de NO pelos BMDMs foi aproximadamente 50% maior do que a produção por MPs. O NO é um mediador inflamatório essencial produzido por macrófagos, que participa do controle de patógenos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Essa diferença ocorre devido a expressão diferencial de fatores de transcrição que regulam a expressão de iNOS, os quais estão presentes em maior abundância nos BMDMs, enquanto MPs expressam mais genes que codificam arginase 1 (ARTYOMOV; SERGUSHICHEV; SCHILLING, 2016). Assim, nossos resultados estão de acordo com os descritos na literatura.

Sabendo que BMDMs e MPs possuem perfis metabólicos distintos e que a molécula CD14 reconhece tanto LPS quanto TsV, utilizamos neste estudo ambas as linhagens celulares e ambos estímulos. Ao analisar os metabólitos de células de ambas as linhagens de animais, cultivadas somente com meio de cultura, observamos que BMDMs já possuem um perfil metabólico distinto quando comparamos camundongos WT e CD14^{-/-}, sendo que nestas células, os metabólitos regulados negativamente foram mais abundantes que os metabólitos regulados positivamente. Entretanto, nas mesmas condições de cultivo, MPs apresentaram um perfil mais homogêneo, ou seja, os metabólitos “*down*” e “*up*” regulados se apresentaram de maneira igualmente distribuídos. Embora os macrófagos desempenhem algumas funções semelhantes na resposta imune e na manutenção da homeostase tecidual, eles possuem características celulares heterogêneas que variam de acordo com a sua localização, função e fenótipo (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI, 2015). Assim, nossos resultados estão dentro do esperado.

Dados da literatura demonstram que a deficiência do CD14 afeta o metabolismo de uma maneira geral. Roncon-Albuquerque e colaboradores (2008) mostraram que camundongos CD14^{-/-} em comparação aos selvagens, não se tornam obesos quando alimentados com dieta rica em gordura e não desenvolvem patologias relacionadas à obesidade, como resistência à insulina e complicações cardiovasculares (RONCON-ALBUQUERQUE et al., 2008). Observaram ainda que nos animais mais velhos essas diferenças são intensificadas, e como consequência os animais deficientes de CD14 têm

período de vida útil aumentada. Empregando cultura de macrófagos, nós avaliamos a produção de metabólitos por BMDMs e por MPs de animais CD14^{-/-} e WT. Observamos que após estímulos com LPS ou TsV por 6 e 12 horas, essas células apresentaram perfis metabólicos distintos. A produção de metabólitos por BMDMs variou de acordo com a linhagem celular, tempo e estímulos recebidos, sendo que metabólitos “*up*” regulados foram mais abundantes no tempo inicial com TsV em células WT e CD14^{-/-}, e nas células WT estimulados com LPS. Entretanto ocorre uma inversão no perfil metabólico após 6 horas com LPS nas células WT, e após 12 horas com ambos os estímulos e linhagens celulares. No entanto, os MPs apresentaram maior quantidade de metabólitos “*up*” regulados em todas as condições de estímulos, exceto após 12 horas com LPS, visto que nesse período de tempo, as células WT não apresentaram diferença no perfil metabólico. Também comparamos metabólitos diferencialmente abundantes e com elevada significância, e outras diferenças foram observadas nos metabólitos analisados. BMDMs apresentaram metabólitos com significância elevada no período de 6 horas, os quais não foram detectados após 12 h com TsV. Entretanto em BMDMs com LPS, os metabólitos presentes apresentaram um perfil semelhante nos dois períodos de tempo analisados. No entanto, os MPs apresentaram produção homogênea de metabólitos após os dois estímulos e em ambos os tempos. Em conjunto, e de acordo com dados da literatura (SORGI, et al., 2017; ARTYOMOV; SERGUSHICHEV; SCHILLING, 2016), nossos resultados, demonstram que o perfil metabólico varia de acordo com o tipo celular e estímulo recebido.

As células respondem de maneiras distintas em termos de crescimento, proliferação e funções efetoras quando submetidas aos desafios. Podem adotar configurações metabólicas distintas, as quais permitem que a célula equilibre seus requisitos de energia, biossíntese molecular e tempo de vida (JANTSCH et al., 2008). Essas alterações, micro ambientais e funcionais, representam perturbações metabólicas significativas que são gerenciadas eficientemente pelas células do sistema imune devido à sua capacidade de reprogramar dinamicamente seu metabolismo. As células mielóides maduras não possuem características proliferativas e, portanto, têm requisitos metabólicos substancialmente diferentes das células linfóides. Macrófagos M1 ativados, células dendríticas (DC) e granulócitos são todos altamente glicolíticos e utilizam pouco da fosforilação oxidativa (OxPhos) para produção de ATP (TANNAHILL et al., 2013, KRAWCZYK et al., 2010). Em macrófagos M1 e DCs ativadas a OxPhos é menos ativa devido a produção de óxido nítrico dependente da enzima NOs. (PEARCE; EVERTS,

2014, JHA et al., 2015). Nessas células, ocorre o redirecionamento de enzimas para gerar moléculas importantes para as funções pró-inflamatórias (TANNAHILL et al., 2013, PEARCE; EVERTS, 2014). As alterações metabólicas após a ativação das DCs ocorrem em duas fases e resultam na mudança metabólica da β -oxidação dos ácidos graxos e OxPhos para a glicólise (PEARCE; EVERTS, 2014). Um aumento inicial na glicólise ocorre alguns minutos após a ativação das DCs para nova biossíntese lipídica, sendo assim, as células elevam sua capacidade de resposta, fato essencial suas funções (EVERTS et al., 2014). Análises para avaliar o metabolismo de ácidos graxos em macrófagos mostraram maior captação de lipídios em resposta à ativação do TLR4 por LPS, especialmente de triglicerídeos no interior destas células, os quais foram estocados como gotículas lipídicas (FEINGOLD et al., 2012; HUANG et al., 2014b). Este fato levou ao aumento na síntese de eicosanoides derivados da via do ácido araquidônico (DENNIS et al., 2010). Por outro lado, células alternativamente ativadas utilizam principalmente vias de metabolismo oxidativo da glicose. A β -oxidação é alimentada por lipídios retirados do microambiente externo e também por lipídios gerados pela síntese de ácidos graxos (ZHU et al., 2014).

Neste projeto, demonstramos que há heterogeneidade nos perfis metabólicos de BMDMs e MPs obtidos das duas linhagens de animais, quando estimuladas com LPS ou com TsV. Ambos subtipos de células apresentam metabólitos únicos para cada estímulo e tempo analisados, embora compartilhem um número pequeno de metabólitos entre si. Os gráficos de pontos (Figuras 5A-B e 9A-B) demonstram que tanto BMDMs quanto MPs apresentam mais vias metabólicas perturbadas após estímulo com LPS. A maioria das vias afetadas após TsV estão relacionadas com metabolismo de aminoácidos. Por outro lado, o LPS foi capaz de induzir alterações em um maior número de vias, as quais incluem metabolismo de aminoácidos, vitaminas, ácido graxo, ciclo da ureia, entre outros. Sorgi et al, (2017) demonstraram que BMDMs liberaram mais ácido araquidônico (AA) e ácido docosaenoico (DHA), e além disso produzem mais PGD_2 e 5-oxo-ETE, mas menos TXB_2 , PGE_2 e LTB_4 quando comparados com MPs após estímulo com LPS. Também foi demonstrado pelo nosso grupo, que animais deficientes de CD14, produzem menos PGE_2 e $\text{IL-1}\beta$, mas mais LTB_4 do que animais selvagens, após serem inoculados intraperitonealmente com TsV, e que MPs liberam menos $\text{IL1}\beta$, após 24 horas de incubação com LPS ou TsV (ZOCCAL et al., 2018). Os dados aqui descritos também mostraram diferenças relevantes em relação aos mediadores lipídicos, quando comparamos células deficientes do receptor CD14 com

células de animais selvagens. Observamos que BMDMs de animais CD14^{-/-} também liberam menos PGE₂ após estímulo de 12 h com LPS, mas contrário ao descrito por Zoccal et al., 2018, não observamos diferenças quando os BMDMs foram estimulados por 6 ou 12 h com TsV. Também, Zanoni et al, (2012) mostraram que a produção de PGE₂ por DCs estimuladas durante 4 horas com LPS é dependente de CD14, e que estas células apresentam menor expressão relativa de Ptges-1, (ZANONI et al., 2012). A discrepância parcial entre dados da literatura e os previamente por nós publicados, com os que apresentados neste projeto, pode ser explicada pela diferença no tempo de incubação e no subtipo celular. Futuramente, novos experimentos deverão ser realizados nas mesmas condições experimentais para comparação.

Em conjunto, nossos dados mostram que o papel da molécula CD14 depende do tipo celular e do estímulo utilizado, e que esta molécula é fundamental para a ativação do metabolismo celular, particularmente das vias metabólicas envolvidas na produção de mediadores lipídicos e de NO.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a molécula CD14 influencia tanto no metabolismo de BMDMs quanto de MPs, embora de maneiras distintas. Além disso as vias metabólicas perturbadas variam de acordo com o estímulo utilizado.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças:** Robbins & Cotran. 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2005.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia básica:** Funções e distúrbios do sistema imunológico. 4. ed. São Paulo: Elsevier, 2014.
- AKIRA, S.; HOSHINO, K. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187 Suppl 2, p. S356-363, 2003
- ARANCIBIA, S. et al. Copper oxide nanoparticles recruit macrophages and modulate nitric oxide, proinflammatory cytokines and PGE2 production through arginase activation. **Nanomedicine**, v. 11, n. 10, p.1237-1251, 2016.
- ARTYOMOV, Maxim N.; SERGUSHICHEV, Alexey; SCHILLING, Joel D. Integrating immunometabolism and macrophage diversity. **Seminars In Immunology**, v. 28, n. 5, p.417-424, 2016.
- BAUMANN, C. L. et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 12, p.2689-2701, 2010.
- BAZIL, V. et al. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. **European Journal of Immunology**, v. 16, n. 12, p. 1583–1589, 1986
- BOSSCHE, J. van D.; O'NEILL, L. A.; MENON, D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? **Trends In Immunology**, v. 38, n. 6, p.395-406, 2017.
- BRUBAKER, S. W.; BONHAM, K. S.; ZANONI, I.; KAGAN, J. C. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. **Annual Review Of Immunology**, v. 33, n. 1, p.257-290, 2015.
- CASELLA-MARTINS, A. et al. Immunomodulatory activity of Tityus serrulatus scorpion venom on human T lymphocytes. **Journal of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p.1-8, 2015.
- CASSADO, A. A.; LIMA, M. R. D.; BORTOLUCI, K. R. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. **Frontiers In Immunology**, v. 6, 2015
- COLOGNA, C. et al. Tityus serrulatus Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p.920-932, 2009.
- CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 642–649, 2015.
- CUPO, P. et al. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 36, n. 1, p. 67–76, 1994.

- CUSINATO, D. A. C. et al. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p.1477-1486, 2010.
- DENNIS, E. A. et al. A Mouse Macrophage Lipidome. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p.39976-39985, 2010.
- ELASS, E. et al. Mycobacterial Lipomannan Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Macrophagic Cells through a Toll-Like Receptor 1 (TLR1)/TLR2- and CD14- Dependent Mechanism. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 7064–7068, 2005.
- EVERTS, B. et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. **Nature Immunology**, v. 15, n. 4, p.323-332, 2014.
- FEI, F.; LEE, K. M.; MCCARRY, B. E.; BOWDISH, D. M. E. Age-associated metabolic dysregulation in bone marrow-derived macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-12, 2016.
- FEINGOLD, K. R. et al. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p.829-839, 2012.
- FUKUHARA, Y. D. M. et al. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p.49-55, 2003.
- GARDINASSI, L. G. et al. Metabolome-wide association study of peripheral parasitemia in *Plasmodium vivax* malaria. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p.533-541, 2017.
- GEISSMANN, F. et al. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p.656-661, 2010.
- GIOANNINI, T. L. et al. Monomeric endotoxin:protein complexes are essential for TLR4- dependent cell activation. **Journal of Endotoxin Research**, v. 11, n. 2, p. 117–123, 2005.
- GIOANNINI, T. L.; WEISS, J. P. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. **Immunologic Research**, v. 39, n. 1–3, p. 249–260, 2007.
- GIOIA, M. di; SPREAFICO, R.; SPRINGSTEAD, J. R.; MENDELSON, M. M.; JOEHANES, Roby; LEVY, Daniel; ZANONI, Ivan. Endogenous oxidized phospholipids reprogram cellular metabolism and boost hyperinflammation. **Nature Immunology**, v. 21, n. 1, p.42-53, 2019.

GIOIA, M. di; ZANONI, I. Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. **Mol Immunol**, v. 63, n. 2, p.143-152, 2014.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HAILMAN, E. et al. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 1, p. 269–277, 1994.

HE, Z. et al. CD14 Is a Co-Receptor for TLR4 in the S100A9-Induced Pro-Inflammatory Response in Monocytes. **Plos One**, v. 11, n. 5, p.1-15, 2016.

HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of beta- glucans by macrophages. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 869–876, 2004.

HOTAMISLIGIL, G. S. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. **Immunity**, v. 47, n. 3, p.406-420, 2017.

HUANG, Y. et al. Toll-like Receptor Agonists Promote Prolonged Triglyceride Storage in Macrophages. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 289, n. 5, p.3001-3012, 2013.

ISBISTER, G. K.; SALUBA BAWASKAR, H. Scorpion Envenomation. **N Engl J Med**, v. 371, p. 457–63, 2014

JANTSCH, J. et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function. **The Journal Of Immunology**, v. 180, n. 7, p.4697-4705, 2008.

JERSMANN, H. P. Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 5, p. icb200562, 2005

JHA, A. K. et al. Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. **Immunity**, v. 42, n. 3, p.419-430, 2015.

KELLY, B.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell Research**, v. 25, n. 7, p.771-784, 2015.

KRAWCZYK, C. M. et al. Toll-like receptor–induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. **Blood**, v. 115, n. 23, p.4742-4749, 2010.

KUMAR, L. et al. Autopsy diagnosis of a death due to scorpion stinging - **A case report. Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 19, n. 8, p. 494–496, 2012.

LAMPROPOULOU, V. et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 1, p.158-166, 2016.

LEE, H.-K. et al. Double-Stranded RNA-Mediated TLR3 Activation Is Enhanced by CD14. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 153–163, 2006.

- LI, Shuzhao et al. Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics. **Plos Computational Biology**, v. 9, n. 7, p.1-11, 2013.
- LOFTUS, R. M.; FINLAY, D. K. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 291, n. 1, p.1-10, 2015.
- LOPEZ-DEE, Z.; PIDCOCK, K.; GUTIERREZ, L. S. Thrombospondin-1: Multiple Paths to Inflammation. **Mediators of Inflammation**, p.1-10, 2011.
- LUCHE, E. et al. Metabolic endotoxemia directly increases the proliferation of adipocyte precursors at the onset of metabolic diseases through a CD14-dependent mechanism. **Molecular Metabolism**, v. 2, n. 3, p.281-291, 2013.
- MACECKOVA, Michaela et al. Bone marrow-derived macrophages exclusively expressed caveolin-2: The role of inflammatory activators and hypoxia. **Immunobiology**, v. 220, n. 11, p.1266-1274, 2015.
- MAGALHÃES, M. M. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 37, n. 8, p. 1155–1164, 1999.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–185, 2013.
- MARIM, F. M. et al. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **Plos One**, v. 5, n. 12, p.1-12, 2010.
- MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. **The Journal Of Immunology**, v. 164, n. 12, p.6166-6173, 15 jun. 2000.
- MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll- like receptors. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 3–10, 2007.
- MIYAMOTO, J. G. et al. A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms. **Toxicon**, v. 141, p.25-33, 2018.
- MOONEY, J. et al. Transcriptional switching in macrophages associated with the peritoneal foreign body response. **Immunology and Cell Biology**, v. 92, n. 6, p.518-526, 2014.
- O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p.553-565, 2016.
- OWEN, J.L. MOHAMADZADEH, M. Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. **Front Physiol**, v.4, p. 159, 2013.
- PARK, B. S.; LEE, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 12, p. e66, 2013.
- PEARCE, E. J.; EVERTS, B. Dendritic cell metabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p.18-29, 2014.

- PETRICEVICH, V. L. Effect of Tityus serrulatus venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 23–31, 2002.
- PETRICEVICH, V. L. et al. Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. **Toxicon**, v. 50, n. 5, p. 666–675, 2007.
- PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the Tityus serrulatus venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 1, p. 39–49, 2005.
- PIMENTA, R. J. G. et al. Selected to survive and kill: Tityus serrulatus, the Brazilian yellow scorpion. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–10, 2019.
- POLTORAK, A. et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.
- PUCCA, M. B. et al. Immunosuppressive evidence of Tityus serrulatus toxins Ts6 and Ts15 insights of a novel K⁺ channel pattern in T cells. p. 240–250, 2015b.
- PUCCA, M. B. et al. Tityus serrulatus venom – A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272–284, 2015a.
- PUGIN, J. et al. CD14 is a pattern recognition receptor. **Immunity**, v. 1, n. 6, p. 509–516, 1994.
- RABY, A. C. et al. Targeting the TLR Co-Receptor CD14 with TLR2-Derived Peptides Modulates Immune Responses to Pathogens. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 185, p. 185ra64-185ra64, 2013.
- RAJIAH, R. et al. CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p.8391-8396, 2015.
- RECKZIEGEL, G. C.; LAERTE, V.; JR, P. Scorpionism in Brazil in the years 2000 to 2012. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 46, p. 1–8, 2014.
- REGO, D. et al. IL-6 Production Is Positively Regulated by Two Distinct Src Homology Domain 2-Containing Tyrosine Phosphatase-1 (SHP-1) Dependent CCAAT/Enhancer-Binding Protein β and NF- κ B Pathways and an SHP-1-Independent NF- κ B Pathway in Lipopolysaccharide-Stimulated Bone Marrow-Derived Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p.5443-5456, 2011.
- REIS, M. B. et al. Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. **Toxicon**, v. 167, p. 174–179, 2019.
- RODRÍGUEZ-PRADOS, J. et al. Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 1, p.605-614, 2010.

- RONCON-ALBUQUERQUE, R. et al. Attenuation of the cardiovascular and metabolic complications of obesity in CD14 knockout mice. **Life Sciences**, v. 83, n. 13-14, p.502-510, 2008.
- SCHIMKE, J. et al. Anti-CD14 mAb treatment provides therapeutic benefit after in vivo exposure to endotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13875–13880, 1998.
- SCHULZ, C. et al. A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. **Science**, v. 336, n. 6077, p.86-90, 2012.
- SHIVE, C. L. et al. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. **AIDS** (London, England), v. 29, n. 10, p. 1263–1265, 2015.
- 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.
- SORGI, C. A. et al. Dormant 5-lipoxygenase in inflammatory macrophages is triggered by exogenous arachidonic acid. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.1-13, 2017.
- SUGIMOTO, M. et al. Non-targeted metabolite profiling in activated macrophage secretion. **Metabolomics**, v. 8, n. 4, p.624-633, 2011.
- TAKATA, K. et al. Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. **Immunity**, v. 47, n. 1, p.183-198, 2017.
- TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p.238-242, 2013
- VALLELIAN, F. et al. Revisiting the putative role of heme as a trigger of inflammation. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 6, n. 2, p.1-15, 30 2018.
- VERZOLA, D et al. Toll-like receptor 4 signalling mediates inflammation in skeletal muscle of patients with chronic kidney disease. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 1, p.131-144, 2016.
- VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, p.391-412, 2018.
- WANG, J. et al. GTS-21 Reduces Inflammation in Acute Lung Injury by Regulating M1 Polarization and Function of Alveolar Macrophages. **Shock**, p.1-39, 2018.
- WINKLER, C. et al. Lipopolysaccharide induced Interleukin-6 production is mediated through activation of ERK 1/2, p38 MAPK, MEK, and NF κ B in chicken thrombocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 73, p.124-130, 2017.
- WIRTHGEN, E.; HOEFLICH, A. Endotoxin-Induced Tryptophan Degradation along the Kynurenine Pathway: The Role of Indolamine 2,3-Dioxygenase and Aryl Hydrocarbon

Receptor-Mediated Immunosuppressive Effects in Endotoxin Tolerance and Cancer and Its Implications for Immunoparalysis. **Journal of Amino Acids**, v. 2015, p.1-13, 2015.

WRIGHT, S. D. CD14 and innate recognition of bacteria. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 1, p. 6–8, 1 1995.

WRIGHT, S. D. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science** (New York, N.Y.), v. 249, n. 4975, p. 1431–1433, 1990.

XUE, J. et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. **Immunity**, v. 40, n. 2, p.274-288, 2014.

ZANONI, I. et al. CD14 and NFAT mediate lipopolysaccharide-induced skin edema formation in mice. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 122, n. 5, p.1747-1757, 2012.

ZANONI, I. et al. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 868–880, 2011.

ZANONI, I. et al. CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. **Nature**, v. 460, n. 7252, p.264-268, 2009.

ZANONI, I.; GRANUCCI, F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 3, p.1-6, 2013.

ZHU, L.; ZHAO, Q.; YANG, T.; DING, W.; ZHAO, Y. Cellular Metabolism and Macrophage Functional Polarization. **International Reviews Of Immunology**, v. 34, n. 1, p.82-100, 2014.

ZOCCAL, K. F. et al. CD36 Shunts Eicosanoid Metabolism to Repress CD14 Licensed Interleukin-1 β Release and Inflammation. **Frontiers In Immunology**, v. 9, p.1-16, 2018.

ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications**, v. 7, 23, 2016.

ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p.1-13, 2016.

ZOCCAL, K. F. et al. Tityus serrulatus venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, n. 7-8, p.1101-1108, 2011.

ZOCCAL, K. F. et al. TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from Tityus serrulatus to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators. **Plos One**, v. 9, n. 2, 2014.

ZOCCAL, K. F. et al. Ts6 and Ts2 from Tityus serrulatus venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**, v. 61, p.1-10, 2013.

ZUBAREV, Roman A.; MAKAROV, Alexander. Orbitrap Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 11, p.5288-5296, 2013.

9. ANEXO



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

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel do receptor CD14 na regulação metabólica de macrófagos estimulados com o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*", registrada sob nº 18.1.228.60.4, sob a responsabilidade de Luana Henrique de Macedo e Lúcia Helena Faccioli, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 13/06/2018 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

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

Colaborador: Luiz Gustavo A. Gardinassi

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	21/06/2018 a 01/07/2020	
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. Isogênico C57BL/6	Cam. Knockout Cd14 ^{-/-}
Nº de animais	30	30
Sexo	Indiferente	Indiferente
Peso/Idade	20-25g	20-25g
Origem	Biotério Central da PUSP RP	Biotério de animais especiais da FMRP USP

Ribeirão Preto, 20 de junho de 2018.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Coordenadora da CEUA-FCFRP