

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

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

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 incontrolláveis, 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 *Il1b*, *Il10*, *Ptges*, *Ptgds*, *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. 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.

3. 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, 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.

