



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA



**ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA POR VENENOS EM MACRÓFAGOS DE
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS PARA DIFERENÇAS
NA INFLAMAÇÃO**

UBERLÂNDIA – MG

2023

NATHALIA CAROLINE TEIXEIRA ZANA

**ATIVACÃO DO INFLAMASSOMA POR VENENOS EM MACRÓFAGOS DE
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE SELECIONADOS PARA DIFERENÇAS
NA INFLAMAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado à Coordenação do Instituto
de Ciências Biomédicas, como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina na Universidade Federal de
Uberlândia.

Orientadora: Prof. Dra. Nancy Starobinas

UBERLÂNDIA – MG

2023

AGRADECIMENTOS

A Dra Nancy Starobinas pela oportunidade de estagiar e desenvolver um projeto de pesquisa no laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. Por sua dedicação, apoio, confiança e acolhimento durante o desenvolvimento deste projeto. Contribuindo para meu crescimento profissional, pessoal e científico.

A todas as pesquisadoras (e o Orlando) do laboratório de Imunogenética que me acolheram como um membro de sua família científica, sempre me dando todo o suporte possível, acreditarem em mim e me proporcionarem todo o conhecimento que possuem.

As companheiras e amigas do laboratório por me darem apoio tanto emocional quanto intelectual, pelas discussões geradas e os momentos de lazer e descontração.

Aos funcionários do Biotério e do Laboratório de Imunogenética por seu trabalho tornando possível a realização do projeto.

Aos meus amigos do Instituto Butantan, Thiago, Diego (Tatuado), Grazy, Bianca N., Ana Peixoto, Suelen, Nayara, Jessica, Anny, Alanis e Renato e todos aqueles que minha memória não me permite lembrar o nome, meu sincero obrigado a todas as risadas, conversas, almoços e cafés da manhã compartilhados, e a todos os momentos que pudemos conviver em 2022.

A minha família Teixeira e Zana que sempre estiveram ao meu lado, por todo apoio, confiança e carinho. Principalmente, ao meu núcleo principal: meus pais (Ireni e Silveira), minha avó (Dona Maria), meu irmão (W Zana) e sua noiva (Jessik).

A todos os professores que fizeram parte de minha graduação, que vieram a fornecer uma fração de seu vasto conhecimento em meio às suas aulas.

Aos meus amigos da graduação, principalmente Alessandra Satokata, Bianca Boaventura, Levy, Clara Bastos e Vinicius que sempre estiveram ao meu lado, em todos os momentos e decisões dessa carreira, e ao Pantanal por proporcionar grandes momentos com eles.

A casa do Zebu (Pupu, Marcelo, Ivan e Ladiel) e amigos da Biologia - UFU que sempre me acolheram em seu lar, proporcionando momentos de alegria quando eu mais precisava.

A todos os membros que passaram pelas Ligas Acadêmicas (LIU, Liase, LAAC e Lagemed – UFU) e aos projetos de extensão (GABA- UFU e Jornal da Biomedicina) meu obrigada por contribuírem com a divulgação científica em nosso país.

A minha psicóloga, Mariana, por todos os momentos de suporte e desenvolvimento psicológico compartilhados durante todo o caminho.

Aos meus amigos Douglas Canella, João Lucas Serrano, Maria Vitória da Silva, Caroline Coutinho, Juliana Juliate, Bruna Bazzanini, e Maurício/Martchello (Minas), pelo companheirismo durante a vida, me dando um porto seguro.

Aos meus amigos de Santa Fé do Sul, Bruno (Batata), Jasmine, Leopoldo, João Rosa e Henrique que sempre estiveram ao meu lado desde a minha infância.

Aos meus amigos de RPG e escritores de fantasia que me proporcionaram momentos de aventura em um mundo imaginário e despertando meu espírito de aventureira

Ao CNPq e a Fundação Butantan pelo apoio financeiro imprescindível para o desenvolvimento do projeto.

A banca avaliadora, Dra. Tássia Rafaella Costa e Me. Hellen Dayane Silva Borges pela disponibilidade em avaliar o trabalho e as contribuições fornecidas.

Finalmente, a todos amigos dessa vida que contribuíram de alguma forma para minha formação pessoal e profissional, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A resposta imune inata é nossa primeira linha de defesa que identifica moléculas como os padrões associados a patógenos (PAMPs), moléculas endógenas produzidas por células danificadas ou mortas (DAMPs) e padrões associados a venenos (VAMPs), que são reconhecidos por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) presentes na superfície de fagócitos. Essa interação gera sinais intracelulares que culminam na ativação da cascata pró-inflamatória do inflamassoma NLRP3 gerando a ativação da caspase-1 e liberação de IL-1 β e IL-18 e levando a piroptose. Para compreender o controle genético envolvido na resposta inflamatória, foram desenvolvidas duas linhagens heterogêneas de camundongos que se diferenciam na resposta inflamatória aguda (AIR). Os animais selecionados para máxima (AIR $_{\text{máx}}$) e mínima (AIR $_{\text{min}}$) apresentam diferenças na secreção da IL-1 β após a ativação do inflamassoma devido a presença de polimorfismo no gene *PYCARD*, codificador da proteína adaptadora ASC, importante na ativação desta via. Ao selecionar esse gene, três sublinhagens foram desenvolvidas: AIR $_{\text{máx}}^{C/C}$, AIR $_{\text{min}}^{C/C}$ e AIR $_{\text{min}}^{T/T}$. Esse modelo nos permite identificar a importância desse gene para via NLRP3, sendo escolhido com o intuito de compreender melhor a relação entre essa via e a ação inflamatória dos venenos. Para isso, foi feita a cultura de macrófagos diferenciados da medula óssea desses animais, e realizada a estimulação com os venenos da *Bothrops jararaca* (BjV) e *Tityus serrulatus* (TsV), sendo dosadas a secreção de IL-1 β em seu sobrenadante. Esses venenos foram escolhidos devido a capacidade inflamatória descrita em literatura. Em nossos resultados, demonstramos que a diferença no alelo do gene *PYCARD* interfere na ativação da via NLRP3 e liberação de IL-1 β , assim como o fundo genético. Os animais AIR $_{\text{máx}}$ secretaram mais IL-1 β que os AIR $_{\text{min}}$. Por outro lado, os animais AIR $_{\text{min}}^{T/T}$ não ativaram o inflamassoma em nenhuma das condições testadas. Os venenos podem funcionar como um segundo mensageiro para ativação desta via, podendo atuar como um DAMP. Dessa forma, nosso estudo auxilia no entendimento dos mecanismos da inflamação no envenenamento causado por esses animais peçonhentos. Além de auxiliar na busca por possíveis alvos terapêuticos na patologia do envenenamento.

Palavras-chave: Inflamassoma; NLRP3; Animais geneticamente selecionados; veneno de *Bothrops jararaca*; veneno de *Tityus serrulatus*;

ABSTRACT

The innate immune response is our first line of defense that identifies molecules such as pathogen-associated patterns (PAMPs), damage-associated molecular pattern (DAMPs) and venom-associated patterns (VAMPs), which are recognized by Recognition Receptors Patterns (PRR) present on the surface of phagocytes. This interaction leads to intracellular signals that culminate in the activation of the pro-inflammatory cascade of the NLRP3 inflammasome, generating the activation of caspase-1 and the release of IL-1 β and IL-18, leading to cell death by pyroptosis. To understand the genetic control involved in the inflammatory response, two heterogeneous strains of mice that differ in the acute inflammatory response (AIR) were developed. The animals selected for maximum (AIRmax) and minimum (AIRmin) showed differences in IL-1 β secretion after inflammasome activation due to the presence of polymorphism in the *PYCARD* gene, coding for the ASC adapter protein, important in activating this pathway. The selection of this gene led to three sublines: AIRmax^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}. This model allows us to identify the importance of this gene for the NLRP3 pathway, reaching a better understanding of the relationship between this pathway and the inflammatory action of venoms. In this study, we differentiated macrophages from the bone marrow of these animals, cultured and stimulated with *Bothrops jararaca* (BjV) and *Tityus serrulatus* (TsV) venoms, and measured IL-1 β secretion in its supernatant. These venoms were chosen due to the inflammatory capacity shown in the literature. In our results, we demonstrate that the difference in the *PYCARD* gene allele interferes with the activation of the NLRP3 pathway and IL-1 β release, as well as the genetic background. The AIRmax animals secreted more IL-1 β than the AIRmin, whether they carry the C/C or T/T alleles of the *PYCARD* gene. On the other hand, the AIRmin^{T/T} mice did not activate the inflammasome in any conditions tested. Venoms can function as a second messenger for activating this pathway, acting as a DAMP, leading to a better understanding of their inflammatory mechanisms. Thus, our study helps to understand the processes of inflammation in envenomation caused by these venomous animals. In addition to assisting in the search for possible therapeutic targets in the pathology of envenomation.

Keywords: Inflammasome; NLRP3; Genetically selected mice; *Bothrops jararaca* venom; *Tityus serrulatus* venom;

LISTA DE ABREVIATURAS

AIR	Resposta Inflamatória Aguda
AIRmáx	Resposta Inflamatória Aguda Máxima
AIRmin	Resposta Inflamatória Aguda Mínima
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
BjV	Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>
C	Controle
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
GSDMD	Gasdermina-D
HRP	Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LPS/L	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MSC-F	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]
NLR	Receptores semelhantes ao NOD
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PG	Prostaglandina
PRR	Receptores do reconhecimento de padrão
Th	Linfócito T auxiliar
TLR	Receptor do tipo Toll
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TsV	Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>
VAMP	Padrões moleculares associados a venenos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1.Imunidade Inata.....	10
1.1Receptores da imunidade inata.....	10
1.2 Inflamassoma	11
2.Relação entre venenos e a ativação do inflamassoma.....	13
3.Linhagem de camundongos geneticamente selecionados	15
3.1 Sublinhagem <i>PYCARD</i>	16
OBJETIVO.....	19
1.Objetivo geral	19
2.Objetivos específicos.....	19
METODOLOGIA	20
1.Animais	20
2.Venenos	20
3.Cultivo de L929 para obtenção do fator de crescimento (MSC-F)	20
4.Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e Cultura celular.....	21
5.Ativação celular	21
6.Ensaio de viabilidade – MTT	23
7.Dosagem de citocinas.....	24
7.1.ELISA IL-1 β	24
7.2.ELISA IL-6 e TNF- α	25
8.Análise Estatística	26
RESULTADOS.....	27
1.Comparação entre as sublinhagens na liberação de IL-1 β por LPS + ATP	27
2.Ensaio de viabilidade celular com ativação por BjV e TsV em macrófagos de camundongos AIRmáx ^{C/C} , AIRmin ^{C/C} e AIRmin ^{T/T}	28
3.Liberação de IL-1 β por estimulação por BjV em macrófagos	30
4.Comparação entre as sublinhagens AIR na liberação de IL-1 β pela ativação celular com BjV	32
5.Análise da ativação da via do inflamassoma NLRP3 pelo veneno da <i>B. jararaca</i>	33

6.Liberação de IL-1 β por estimulação por TsV em macrófagos.....	35
7.Comparação entre as sublinhagens AIR na liberação de IL-1 β pela ativação celular com TsV	37
8.Análise da ativação da via do inflamassoma NLRP3 pelo veneno da <i>T. serrulatus</i>	38
9.Verificação da utilização do receptor P2X7 pelo TsV	40
10.Liberação de IL-6 e TNF- α pela estimulação do veneno	42
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	50

INTRODUÇÃO

1. Imunidade Inata

O sistema imunológico é o sistema responsável pela proteção do organismo, para isso são utilizados mecanismos de reconhecimento, tais como seus receptores. Além disso, ele é regulado constantemente por si mesmo, evitando com que haja uma resposta imunológica exacerbada e desta forma, mantendo a homeostase do organismo. Esse sistema é classificado em inato e adaptativo (MURPHY, 2014).

Um indivíduo saudável tem o sistema inato em prontidão, assim, possibilitando uma resposta rápida a possíveis injúrias. Caso ocorra um contato com microrganismos, há a princípio as barreiras físicas e químicas, como a barreira epitelial, de mucosa e células que secretam antibióticos naturais no epitélio que atuam como primeiros mecanismos de proteção. Quando essas são superadas ou evadidas, o sistema complemento e os fagócitos respondem rapidamente a essa exposição (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

Dentre as reações do sistema imune inato a inflamação desempenha um papel importante com a ativação de leucócitos e proteínas plasmáticas no local da infecção ou de um dano tecidual, destruindo principalmente microrganismos extracelulares. Essa reação ao liberar citocinas e mediadores inflamatórios gera calor, dor, rubor e inchaço. Os macrófagos e neutrófilos são as principais células envolvidas, cujo reconhecimento da presença de um patógeno ou de um dano tecidual, ocorre pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017; MURPHY, 2014).

1.1 Receptores da imunidade inata

Os PRRs estão presentes em todas as células mononucleares. Esses reconhecem moléculas microbianas denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), componentes compartilhados pelos microrganismos do mesmo tipo, dentre eles podemos destacar endotoxina bacteriana denominada de lipopolissacarídeo (LPS), ilhas CpG não metiladas, flagelina e entre outros. Além disso, há o reconhecimento dos padrões moleculares associados a danos (DAMPs) como as proteínas induzidas por

estresse, a adenosina trifosfato (ATP) e cristais como o urato monossódico (AMARANTE-MENDES *et al.*, 2018; NETEA *et al.*, 2016).

Dentre os receptores pertencentes ao PRRs, há os receptores do tipo Toll (TLRs), sendo um dos primeiros identificados, que desempenham papel na inflamação. Nos seres humanos existem dez genes que expressam um tipo específico de TLR, sendo dedicado a reconhecer um PAMP específico (LI *et al.*, 2021; MEDZHITOV, 2001). Além disso, esse receptor pode reconhecer padrões moleculares existentes nos venenos, denominados de VAMP (padrões moleculares associados a venenos), moléculas que são injetadas no hospedeiro gerando um reconhecimento pelo PRR, e desencadeando a inflamação (RYAN *et al.*, 2021; ZOCCAL *et al.*, 2014).

Esses receptores podem ser divididos em: acoplados a membrana plasmática ou encontrados na membrana do endossomo. Os TLRs são proteínas transmembranas que possuem um domínio TIR (domínios Toll/Interleucina-1) em sua porção citoplasmática. Quando ativados eles desencadeiam a expressão de citocinas como interferons e interleucinas, e induzem a ativação do fator de transcrição NF- κ B (MEDZHITOV, 2001).

Além desses receptores, a imunidade inata possui os receptores semelhantes ao NOD (NLRs), que detectam produtos patogênicos no citoplasma, sendo receptores intracelulares. Eles são compostos por diversos domínios. Sua porção central é composta pelo NOD ou NACHT responsável por sua oligomerização e ligação a ácidos nucleicos, que está associado ao domínio rico em repetições de leucina na porção C-terminal, denominado de domínio LRR. Na região N-terminal se encontra a porção efetora e variável, que possui o domínio de recrutamento de caspase (CARD) e a presença do domínio de pirina (PYD). Estes domínios são cruciais para cascatas inflamatórias e sinais apoptóticos por via da ativação de caspases e caracterizando o grupo designado como NLRP (MALIK; KANNEGANTI, 2017).

1.2 Inflamassoma

Dentre os receptores da imunidade inata, os receptores NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4 e NAIP, membros da família NLRs, e os PRRs que contêm pelo menos um domínio PYD, como AIM2 e a pirina foram descritos como membros do inflamassoma (AWAD *et al.*, 2018).

O inflamassoma é um complexo proteico multimérico composto por um receptor PRR associado a uma proteína adaptadora ASC e ao precursor enzimático inativo pró-

caspace-1 (Figura 1) (MALIK; KANNEGANTI, 2017). Para a ativação do NLRP3, por exemplo, é necessário a presença de dois sinais, o primeiro deles é um componente bacteriano como o LPS, que irá sinalizar a transcrição da pró-IL-1 β e pró-IL-18 e do NLRP3, e um segundo sinal que promoverá a associação dos componentes do inflamassoma e promoção da tradução e liberação das citocinas pró-inflamatórias, podendo ter diversas origens (PAMPs, DAMPs e VAMPs) (CHAN; SCHRODER, 2020).

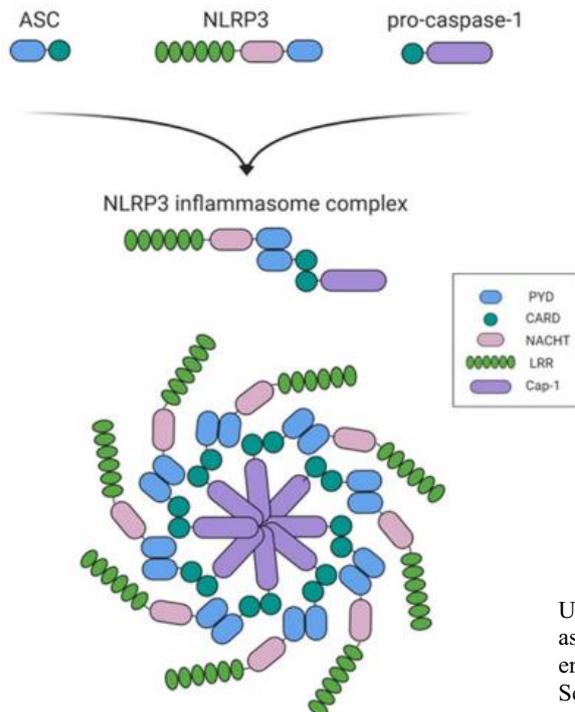


Figura 1. **Composição do inflamassoma NLRP3.** Um complexo multimérico composto por um receptor PRR associado a uma proteína adaptadora ASC e o precursor enzimático pró-caspase-1. Fonte: Figura modificada de Seok et al. 2021.

A ativação do receptor gera o recrutamento do adaptador ASC, que ao se oligomerizar forma os ASCspecks que recrutam a pró-caspase-1. Ao se autoclivar essa proteína se torna ativa e suas subunidades irão clivar a pró-IL-1 β e pró-IL-18, tornando-as ativas. Além disso, a caspase cliva a molécula de gasdermina-D (GSDMD) ocorrendo a liberação da porção N-terminal desta proteína que ao se oligomerizar forma um poro na membrana plasmática resultando em um tipo de morte celular denominado piroptose. Durante esse processo o ASCspeck é liberado, ficando no meio extracelular (eASC speck), podendo contribuir com a propagação da inflamação através da fagocitose e a ativação de células circulantes (Figura 2) (SOUZA; STAROBINAS; IBAÑEZ, 2021).

Esse complexo proteico atua benéficamente durante uma doença infecciosa, contribuindo para a eliminação de patógenos. Por outro lado, patologicamente sua ativação excessiva foi descrita em doenças com perfis inflamatórios como artrite

reumatoide, Alzheimer, obesidade e diabetes (LI *et al.*, 2021). Além disso, estudos recentes observaram a ativação dessa via por estímulos de venenos (PALM; MEDZHITOV, 2013).

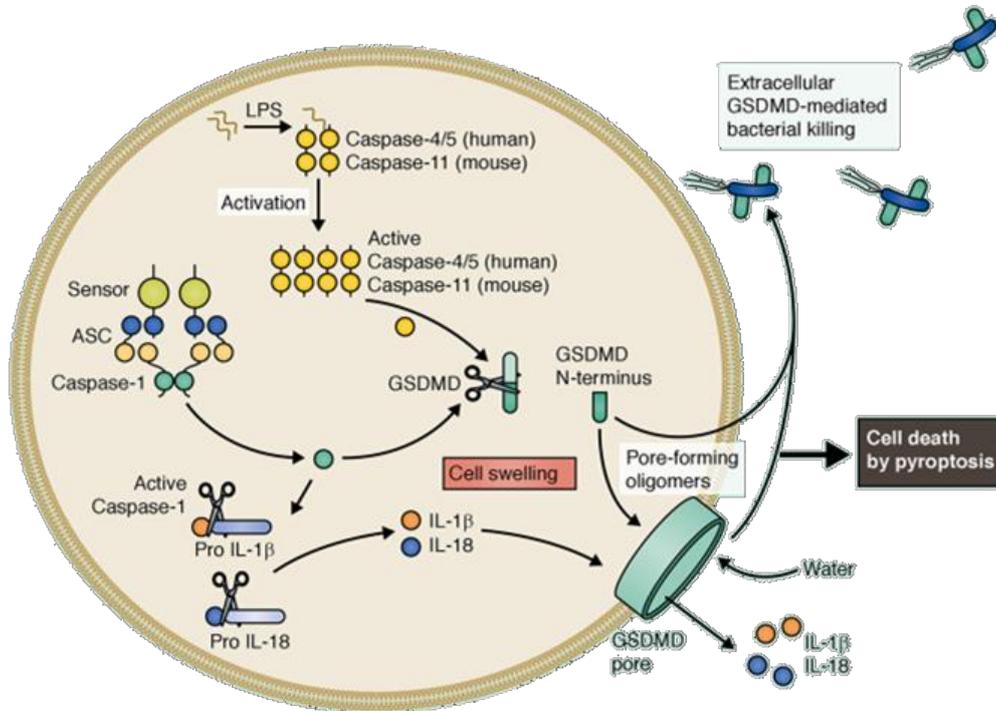


Figura 2. Via do inflamassoma NLR3 e piropotose. Fonte: Figura modificada de Mali e Kanneganti, 2017.

2. Relação entre venenos e a ativação do inflamassoma

Dentre os animais de maior importância médica no território brasileiro, destacam-se os escorpiões do gênero *Tityus*, pertencente à família Buthidae com mais de 1340 espécies atualmente (REIN, 2023). A espécie *Tityus serrulatus*, popularmente conhecido como escorpião-amarelo, é considerado o escorpião mais letal da América do Sul. Essa espécie é amplamente distribuída no Brasil e suas picadas representam um grande problema para a saúde pública no país (COLOGNA *et al.*, 2009; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2021; PUCCA *et al.*, 2015).

O veneno de *T. serrulatus* (TsV) é uma rica fonte de componentes com diversas atividades biológicas e alta especificidade para seus alvos. Sendo composto, principalmente, por neurotoxinas, enzimas (como hialuronidase, serinoprotease e metaloproteínase) e peptídeos potenciadores de bradicinina, inibidor de caliceína e natriuréticos, aminoácidos livres e compostos como muco, sais inorgânicos, lipídios,

aminas e nucleotídeos. As neurotoxinas são os componentes mais estudados, principalmente por sua interação com os canais de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}) e sua importância para a compreensão do envenenamento escorpiano (AMORIM *et al.*, 2019; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2021; PUCCA *et al.*, 2015).

A interação do veneno com as células do organismo induz a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios como IL-1 α , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-10, LTB4 e prostaglandina E2 (PGE2) (ZOCCAL *et al.*, 2014). Toxinas capazes de atuar em canais iônicos dependentes de voltagem desempenham um papel na resposta imune e desencadeiam a liberação desses mediadores, que ao entrar no sistema circulatório provocam alterações cardiorrespiratórias (PETRICEVICH, 2010; PUCCA *et al.*, 2015).

No trabalho de ZOCCAL *et al.*, 2014 não foi observado a liberação de IL-1 β em macrófagos derivados de medula de animais portadores de genes inativados para NLRP3, Asc e capase-1/11 (*knockout*) mostrando o papel dos componentes do inflamassoma induzidos pelo TsV. Além disso, foi observado um aumento de PGE2, sugerindo que o estímulo do TsV teria seu início pela liberação de PGE2, levando a produção de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), ativando a proteína quinase A, que por sua vez levaria a ativação do fator de transcrição NF- κ B, conseqüentemente a ativação do inflamassoma e liberação de IL-1 β .

As serpentes do gênero *Bothrops* também apresentam grande importância médica nacional, uma vez que causam cerca de 90% dos acidentes ofídicos anuais registrados no Brasil (MELGAREJO, 2009). *Bothrops jararaca* é um dos mais abundantes viperídeos do território nacional e uma das serpentes de maior importância na Saúde Pública nas regiões Sul e Sudeste do país (BERNARDE, 2014; CARRASCO *et al.*, 2016).

O veneno de *B. jararaca* (BjV) é uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e carboidratos. Metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A2 e lectinas do tipo C constituem as classes de toxinas mais abundantes. Essas proteínas, em sua maioria, apresentam atividade enzimática gerando necrose tecidual, edema, toxicidade celular, hemorragia e reações inflamatórias (CARNEIRO *et al.*, 2008; KISAKI *et al.*, 2021; ZOCCAL *et al.*, 2018). Outros componentes do veneno botrópico presentes em menores concentrações são L-aminoácido oxidases, hialuronidases, desintegrinas, fatores de crescimento, peptídeos antimicrobianos e inibidores de proteases (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017).

A resposta inflamatória induzida por BjV regula os eventos celulares e vasculares estimulando a ativação e o tráfego de células para os tecidos danificados, resultando em

acúmulo de leucócitos e infiltração de células inflamatórias (VALDERRAMA *et al.*, 2016). A inflamação aguda induzida pelo BJV é caracterizada pelo aumento nas concentrações de leucotrieno B4, tromboxano A2, ativação da via do complemento e ativação de macrófagos estimulando o aumento na liberação de H₂O₂ e NO e na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, INF- γ) e atividade reguladoras (IL-4 e IL-10) (CARNEIRO *et al.*, 2002; LEONEL *et al.*, 2022; VALDERRAMA *et al.*, 2016). Mediadores da resposta imune como citocinas, IL-6, IFN- γ e TNF- α estão fortemente implicados nos processos patogênicos do veneno de *B. jararaca*, e na gravidade da reação do envenenamento e sua capacidade de alterar o balanço da resposta Th1/Th2 (VALDERRAMA *et al.*, 2016)

Em estudos de nosso grupo quando inoculado subcutâneo o BJV em camundongos AIRmáx e AIRmin foi visto um aumento da expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no infiltrado celular desses animais (CARNEIRO *et al.*, 2002). Além disso, outro grupo também avaliou a liberação de IL-1 β pelo veneno de *B. jararacussu* e de *B. jararaca* utilizando uma linhagem de macrófago alveolar de camundongo (AMJ2-C11) e a linhagem de monócito humano THP-1. Em ambas as linhagens foi vista a liberação de IL-1 β sendo modulada por prostaglandina E2 e o leucotrieno B4. Além disso, esses venenos promoveram o aumento de fosforilação de NF- κ B nas células THP-1 (ZOCCAL *et al.*, 2018)

3. Linhagem de camundongos geneticamente selecionados

Visando estudar o controle genético da resposta inflamatória, os pesquisadores do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, mantêm duas linhagens heterogêneas de camundongos que se diferenciam significativamente na capacidade de desenvolver uma resposta inflamatória aguda (AIR). Essa diferenciação foi feita a partir de uma seleção genética bidirecional, obtendo duas linhagens denominadas de AIRmáx e AIRmin, para máxima e mínima resposta, respectivamente (IBANEZ *et al.*, 1992).

Para iniciar a seleção, foram utilizadas oito linhagens isogênicas (A/J; BALB/c; C57BL/6J; CBA/J; DBA/2J; P/J; SJL/J e SWR/J), que resultaram em híbridos F1. O acasalamento desses híbridos, gerou uma população segregante F2, que originou a população F0 geneticamente heterogênea. Nesta última, os animais apresentaram alta ou baixa resposta inflamatória aguda, de acordo com quantidade de leucócitos e o teor de

extravasamento de proteínas no local após a inoculação de biogel no tecido subcutâneo, esses animais foram sendo acasalados mantendo-se o perfil de cada linhagem e suas respostas inflamatórias foi sendo acompanhada por experimentação. Por conseguinte, foram mantidas gerações obtendo-se a máxima separação fenotípica entre as linhagens. Resultando em animais com conservação de fenótipos extremos de máxima (máx.) e mínima (min) resposta inflamatória aguda (AIR) mantendo o fundo genético heterogêneo (Figura 3) (IBANEZ *et al.*, 1992).

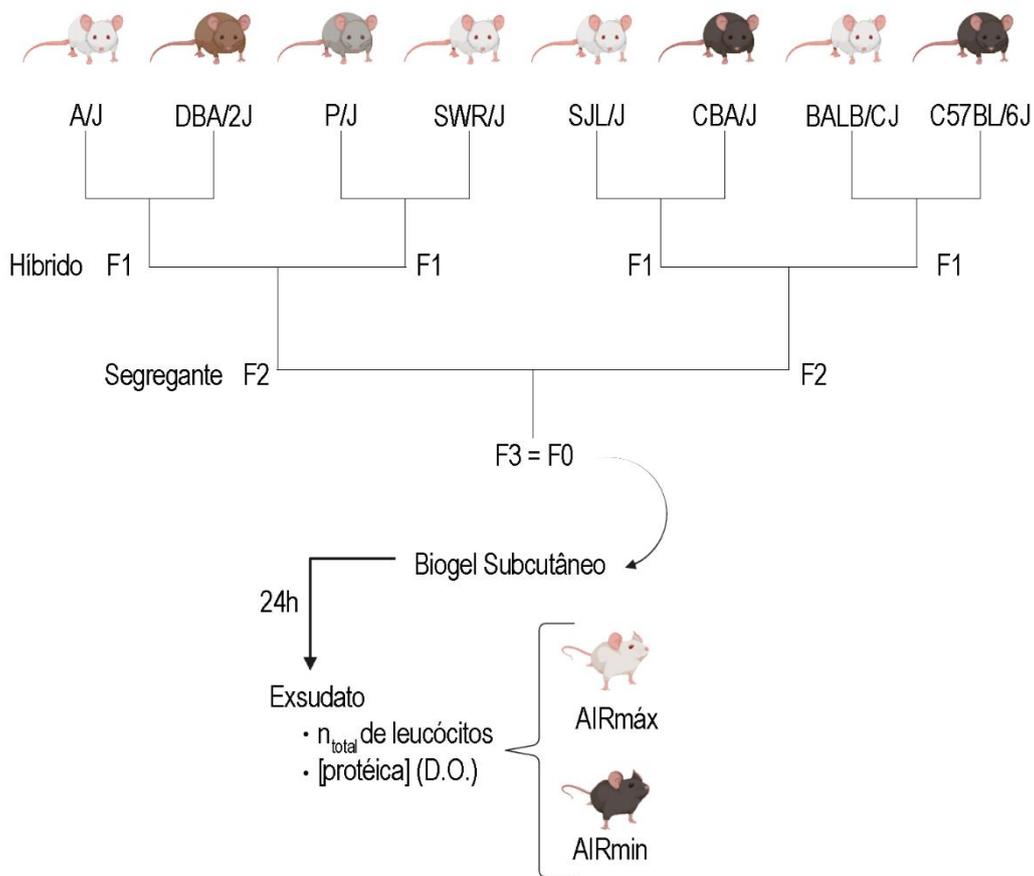


Figura 3. **Seleção bidirecional dos animais AIRmáx e AIRmin.** Animais isogênicos foram acasalados resultando em híbridos F1, cujo acasalamento desses gerou uma população segregante F2 que originou a população F0, geneticamente heterogênea. A partir da inoculação do biogel subcutâneo, foram selecionados os animais para máxima (AIRmáx) e mínima (AIRmin) resposta inflamatória aguda. Fonte: Autor, criado com BioRender.com

3.1 Sublinhagem *PYCARD*

Por meio de ensaios genéticos descrevemos uma região do cromossomo 7 no locus *Irm-1* responsável pela capacidade inflamatória observada pela secreção de IL-1 β (VORRARO *et al.*, 2010). Dentre os genes situados nesse *locus*, alguns apresentaram

polimorfismos, como o gene *PYCARD* ou *ASC*, que codifica a proteína adaptadora do inflamassoma envolvido no processamento das citocinas IL-1 β e IL-18, uma mutação nessa proteína pode prejudicar sua função.

Avaliando o polimorfismo do gene *PYCARD* foi observado que os animais AIRmáx, secretam altas concentrações de IL-1 β e apresentaram genótipo homocigoto C/C, demonstrando que o alelo normal do *PYCARD* está fixado em homocigose nesta linhagem. No entanto, entre os animais AIRmin, a concentração de IL-1 β foi menor e variava bastante entre os animais, sendo que a maioria apresentava heterocigose C/T. Como o genótipo de *PYCARD* não estava fixado nesta população, foram produzidos em nosso laboratório através de acasalamentos assistidos por genotipagem, três sublinhagens: AIRmáx^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}. Expressando diferentes genótipos para o gene (Figura 4).

Nossos resultados mostraram que a variação dos genótipos não influencia na modulação fenotípica da resposta inflamatória ao Biogel. Desta forma, os diferentes genótipos do *PYCARD* nos animais AIRmin não influenciou no número de células infiltradas nem no teor de proteína no exsudato que se mostrou significativamente maior em AIRmáx quando comparado aos animais AIRmin (BORREGO *et al.*, 2022).

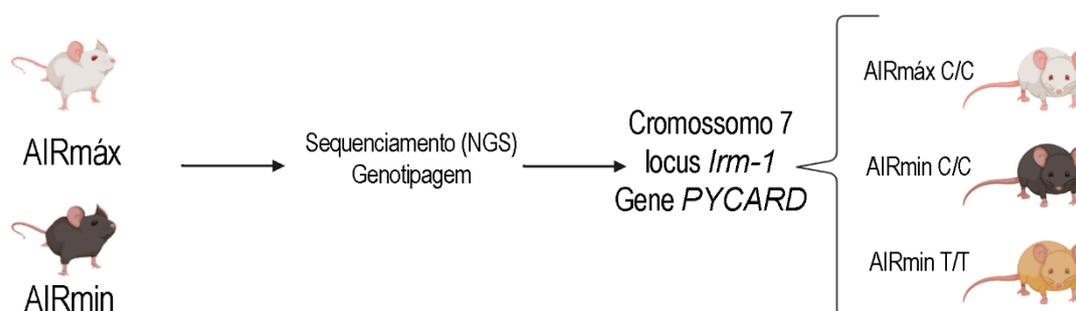


Figura 4. **Seleção do gene *PYCARD* na linhagem AIR.** Seleção feita através do sequenciamento de nova geração (NGS) nos animais AIRmáx e AIRmin que apresentavam diferenças na secreção de IL-1 β , gerando três sublinhagens: AIRmáx^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}. Fonte: Autor, criado com BioRender.com

Quando avaliado a estimulação do inflamassoma NLRP3 por meio da produção de IL-1 β , pode-se observar que a produção da citocina nos sobrenadantes das células estimuladas com LPS + ATP, foram diferentes entre as linhagens. As células de camundongos AIRmáx^{C/C} apresentaram uma alta concentração de IL-1 β . Já entre as sublinhagens de AIRmin, que expressam diferentes genótipos para o gene *PYCARD*, os animais homocigotos para o alelo C/C também apresentam produção de IL-1 β , porém em

níveis menores do que os animais AIRmax^{C/C}. Enquanto os camundongos AIRmin^{T/T} não produziram IL-1 β (BORREGO *et al.*, 2022).

Estudos do nosso grupo mostraram que a reação inflamatória é um fator importante no envenenamento por *Bothrops sp.* Apesar dos efeitos letais do veneno serem semelhantes nas linhagens AIRmáx e AIRmin, elas apresentaram diferenças significantes quanto à reação inflamatória local. O veneno induziu a formação de edema e uma maior migração de células nos animais AIRmáx do que no AIRmin. Além disso, ocorreu uma maior produção local de PGE2, IL-6, TNF- α e IFN- γ e uma liberação de H₂O₂ e NO nos macrófagos peritoneais, sendo mais elevada no AIRmáx em relação ao AIRmin (CARNEIRO *et al.*, 2002). Os mesmos autores demonstraram que as principais células migratórias eram neutrófilos induzidos pelo aumento na expressão do MIP-2, moléculas de adesão presentes no endotélio. A secreção da citocina IL-1 β foi diferente sendo maior nos animais AIRmáx que receberam o veneno, tanto em relação ao controle quanto aos animais AIRmin (CARNEIRO *et al.*, 2008). Dessa forma, esses modelos são adequados para investigar o controle genético dos mediadores produzidos pelos venenos de animais peçonhentos.

Visando compreender um dos mecanismos utilizados pela imunidade inata. O presente trabalho buscou relacionar a inflamação desencadeada pelo BjV e TsV com a ativação da via do inflamassoma NLRP3, se utilizando de animais da linhagem AIR. Desta forma, aprofundando os estudos sobre o efeito dos venenos e a ativação do inflamassoma nesses animais, compreendendo o efeito do genótipo C/C e T/T do gene *PYCARD* na ativação da resposta inflamatória. Elucidando as possíveis vias de ativação utilizadas pelos venenos, e assim, auxiliando a encontrar possíveis alvos para tratamento de acidentes causados por animais peçonhentos.

OBJETIVO

1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do veneno da *Bothrops jararaca* e do *Tityus serrulatus* na ativação do inflamassoma em macrófagos de animais selecionados para diferente capacidade inflamatória, portadores dos genótipos C/C e T/T do gene *PYCARD*.

2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade em diferentes concentrações do BjV e TsV em macrófagos de murinos;
- Avaliar a ativação do inflamassoma pelo BjV e TsV;
- Analisar a relevância do polimorfismo do gene *PYCARD* em relação a ativação do inflamassoma sob o estímulo dos venenos;
- Determinar a liberação de IL-1 β por macrófagos das sublinhagens de camundongos sob estímulo dos venenos;
- Compreender a utilização da via do inflamassoma NLRP3 por BjV e TsV;
- Avaliar o uso do receptor P2X7 para desencadear o segundo sinal pelos venenos *B. jararaca* e *T. serrulatus*;
- Detectar a produção de IL-6 e TNF-alfa frente aos diferentes estímulos em macrófagos de animais da sublinhagem AIR.

METODOLOGIA

1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da sublinhagem *PYCARD*, sendo eles: AIRmáx^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}. As idades utilizadas foram de 3 meses, com seus pesos entre 20 e 25 gramas. Sendo mantidos e produzidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, São Paulo/SP em condições padrões de criação, com ração e água *ad libitum* e em ciclo claro/escuro de 12 horas.

Esses experimentos foram realizados sob aprovação da Comissão de ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) nº 6965020222, presente no Anexo I.

2. Venenos

Foram utilizados o veneno bruto liofilizado da serpente *B. jararaca* e do escorpião *T. serrulatus*, produzido e cedido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo/SP.

Para ambos os venenos foram feitas uma solução de 1 mg/mL em meio RPMI 1640 que foi filtrada em filtro de 0,22 µm. O veneno da *B. jararaca* teve uma pré-diluição a 50 µg/mL, e foi utilizado nas concentrações finais de 5,10 e 25 µg/mL. Para o veneno de *T. serrulatus* foi feita a pré-diluição a 100 µg/mL e foram utilizadas as concentrações finais de 10, 25 e 50 µg/mL. Todas as pré-diluições foram feitas com meio M10 (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 40 mg/mL de gentamicina e 200mM glutamina).

3. Cultivo de L929 para obtenção do fator de crescimento (MSC-F)

Para diferenciação celular das células da medula óssea dos animais, foi utilizado o sobrenadante da linhagem de L929. Estas células são fibroblastos originados de camundongos que secretam o fator estimulante de colônias de macrófagos (MSC-F).

Essa cultura foi cultivada em meio M10 por 7 dias a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 1300 RPM por 10 min a 4 °C,

sendo descartado o *pellet* com *debris* celulares. A suspensão do centrifugado foi testada e filtrada em filtro de 0,22 μm , e conservada a -20°C até o momento do uso.

4. Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e Cultura celular

Macrófagos derivados de células da medula óssea foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por ZAMBONI; RABINOVITCH, 2003 e FERRARI; FORNASIERO; ISETTA, 1990 com modificações.

As células da medula óssea do fêmur e da tíbia dos animais foram obtidas e lavadas com RPMI. Posteriormente foram centrifugadas a 1200 RPM por 5 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado, e adicionado 5 mL de Tampão de Lise, e incubado por 5 min em banho maria a 37°C . Após o período foi adicionado o mesmo volume de M10, para neutralizar a reação do tampão, e foi centrifugado a 1200 RPM por 5 min a 4°C , sendo descartado o sobrenadante.

As células foram ressuspensas em 1 mL de M10 e $10\mu\text{L}$ foram utilizados para fazer a contagem celular com azul de tripan. A contagem foi realizada utilizando Câmara de Malassez. O número de células foi ajustado para 4×10^6 células/*well* em 3 mL de meio M10 contendo 30% Sobrenadante de L929 e colocadas em placas de 6 *wells*. A cultura ficou por 7 dias em estufa a 37°C e 5% CO_2 . No quarto dia era feita a troca de meio M10 contendo 30% Sobrenadante de L929 com o volume de 3mL/*well*.

Após uma semana, os macrófagos foram coletados utilizando PBS gelado 5% Soro Fetal e com rodinho. O volume coletado foi centrifugado a 1200 RPM por 5 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado, o *pellet* celular foi utilizado para contagem celular, como descrito anteriormente. O número de células foi ajustado para 2×10^5 células/*well* em 200 μL de M10 em placas de 96 *wells* para as células serem ativadas no dia seguinte.

5. Ativação celular

As células foram estimuladas para a ativação do inflamassoma. Foram feitos o total de 9 grupos principais, sendo eles: Não estimulados (Controle – C); LPS por 4 horas; LPS por 24 horas; ATP por 1 hora; Controle positivo (LPS + ATP); apenas BjV em diferentes concentrações; apenas TsV em diferentes concentrações; LPS + BjV em

diferentes concentrações; LPS + TsV em diferentes concentrações. O LPS e os venenos foram todos filtrados em filtro de 0,22 µm antes de serem adicionados à cultura.

Após 24 horas do plaqueamento na placa de 96 *wells*, todos os poços tiveram seu meio trocado e reajustado para o volume de acordo com o estímulo que iriam receber. Os grupos que possuíam LPS 1µg/mL por *well* foram estimulados por 4 ou 24 horas, sendo feito uma solução mãe a 200 µg/mL e uma pré-diluição a 20 µg/mL, ambas diluídas em RPMI. O grupo com ATP 5mM por *well* associado ao LPS tiveram o reagente adicionado ao LPS permanecendo por uma hora, neste caso foi feito uma solução a 100 mM diluído em RPMI (Figura 5.A). Na quarta hora, o sobrenadante do LPS 4h, ATP e LPS + ATP foram coletados e armazenados a -20 °C e adicionado M10 em seus poços.

Todos os grupos tiveram seu meio trocado e reajustado de acordo com o estímulo. Foram adicionados BjV nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 25 µg/mL e para o TsV a 5, 10, 25 e 50 µg/mL por 4 horas (ZOCAL *et al.*, 2011, 2018) (Figura 5.B).

Para os estímulos com LPS + BjV, LPS + TsV e LPS 24h. Após as 4 horas do LPS 1µg/mL, para os dois primeiros grupos, era feita a troca de meio e adicionado os venenos nas concentrações de 5, 10 e 25 µg/mL e 10, 25 e 50 µg/mL, respectivamente, por 24 horas (Figura 5.B). Para o grupo LPS 24h era adicionado o LPS 1µg/mL neste período.

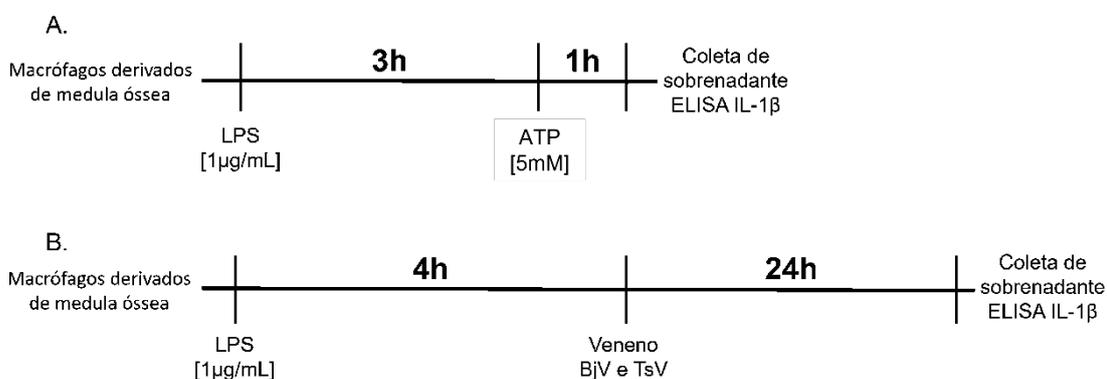


Figura 5. **Linha do tempo dos estímulos para a coleta de sobrenadante.** Linha temporal da estimulação nos macrófagos (BMDMs) pelo LPS (1µg/mL) por 3 horas e ATP (5mM) por 1h (A) e pelo LPS (1µg/mL) por 4 horas e venenos em diferentes dosagens por 24 horas

Após esses estímulos, esses grupos foram submetidos a dois bloqueadores de receptor. O MCC 950 é o inibidor da ativação do receptor NLRP3, e consequentemente gera o bloqueio da ativação da caspase-1 e da liberação e processamento IL-1β (Figura 6).

Outro inibidor utilizado foi A9736, um hidrato de cloridrato A-438079, com função antagonista seletiva do purinorreceptor P2X7. Esse receptor está associado a ligação do ATP extracelular, que desencadeia a morte celular.

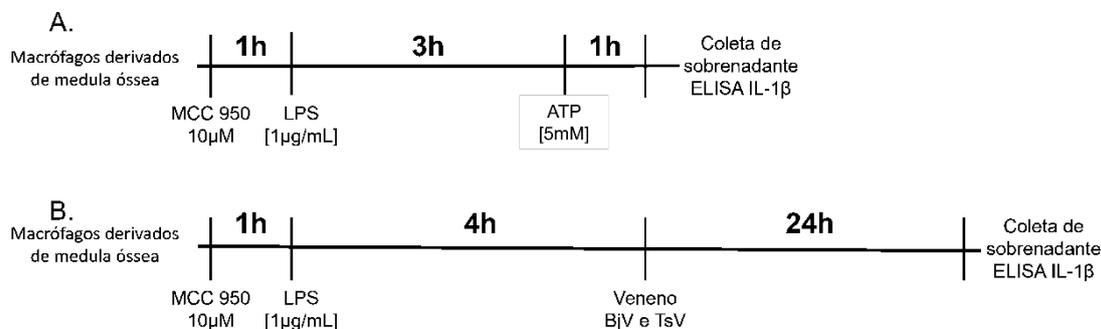


Figura 6. **Linha do tempo dos estímulos utilizando inibidor MCC 950 para a coleta de sobrenadante.** Linha temporal da estimulação nos macrófagos (BMDMs) pelo MCC 950 (10µM) por 1h, seguido de LPS (1µg/mL) por 3 horas e ATP (5mM) por 1h (A) e pelo MCC 950 (10µM) por 1h, seguido LPS (1µg/mL) por 4 horas e venenos em diferentes dosagens por 24 horas.

Ambos os inibidores foram adicionados 1 hora antes da ativação celular, sendo o primeiro antes do LPS e o segundo antes do ATP ou venenos. Ao final da incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C e as células foram utilizadas para o ensaio de viabilidade MTT (Figura 7).

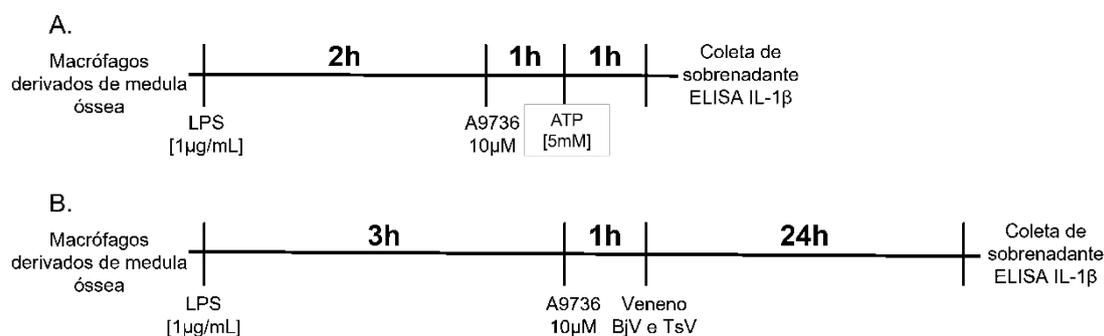


Figura 7. **Linha do tempo dos estímulos utilizando inibidor A9736 para a coleta de sobrenadante.** Linha temporal da estimulação nos macrófagos (BMDMs) pelo LPS (1µg/mL) por 3 horas, A9736 (10µM) por 1h, seguido e ATP (5mM) por 1h (A) e pelo LPS (1µg/mL) por 4 horas, A9736 (10µM) por 1h, seguido dos venenos em diferentes dosagens por 24 horas

6. Ensaio de viabilidade – MTT

Para avaliar a viabilidade celular dos macrófagos após serem submetidos aos diferentes estímulos, foi utilizado o teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]} como descrito em MOSMANN, 1983 com alterações.

Após o período de cada tratamento foi adicionado MTT (5 mg/mL) em M10 por 2 horas. O controle positivo de morte celular recebeu 10 µL de Triton. Em seguida foi retirado todo o meio e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 10 minutos,

para a dissolução do formazan obtido após a reação MTT com as células vivas (Figura 8).

A leitura foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda 570 nm. A sobrevida foi calculada em porcentagem, relacionando a absorbância do controle positivo e negativo. Sendo este experimento realizado oito vezes.

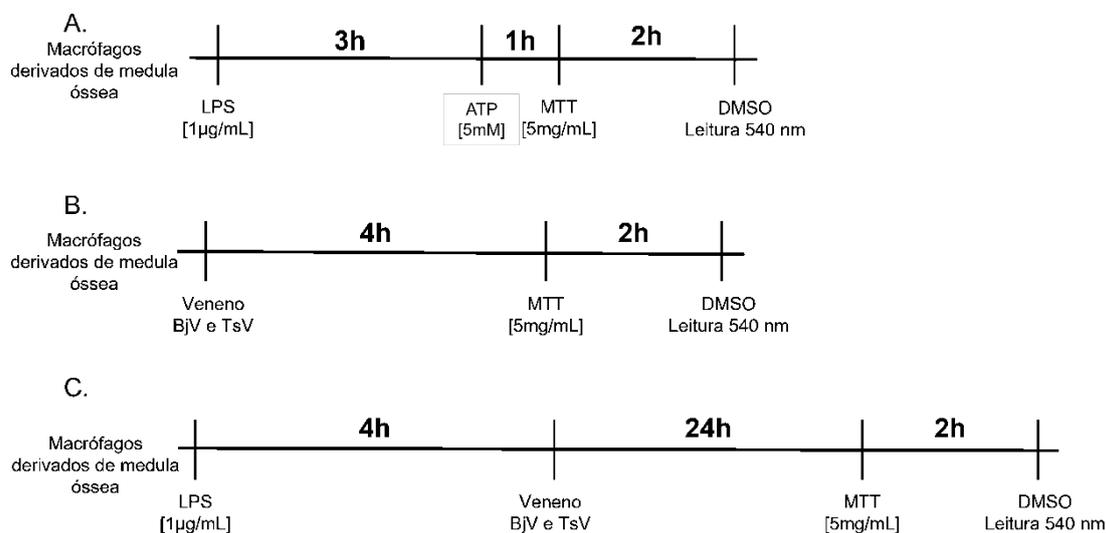


Figura 8. **Linha do tempo dos estímulos para ensaio de viabilidade celular.** Linha temporal da estimulação nos macrófagos (BMDMs) pelo LPS (1µg/mL) por 3 horas e ATP (5mM) por 1h seguido do ensaio MTT (A), apenas pelo veneno por 4 horas seguido do ensaio MTT (B) e pelo LPS (1µg/mL) por 4 horas e venenos em diferentes dosagens por 24 horas seguido do ensaio MTT (C).

7. Dosagem de citocinas

O sobrenadante coletado foi utilizado para dosagem das citocinas de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Foram utilizados o Kit da InvitrogenTM *by Thermo Fisher Scientific* para IL-1 β , e o Kit OptEIATM *Mouse by BD Biosciences* para as citocinas IL-6 e TNF- α , seguindo as instruções do fabricante.

7.1. ELISA IL-1 β

Utilizou-se uma placa de 96 *wells* cuja sensibilização foi feita com incubação *overnight* a 4 °C do anticorpo de captura diluído em tampão fosfato. Foram feitas 3 lavagens com PBS Tween 0,05% e o bloqueio com o tampão de bloqueio do kit foi feito por uma hora em temperatura ambiente, além disso este tampão foi utilizado como diluente para as soluções do anticorpo de detecção e estreptavidina (HRP). A proteína

recombinante para a curva padrão foi reconstituída a 2000 $\mu\text{g/mL}$ meia hora antes de sua incubação e as amostras foram retiradas para descongelarem em gelo. Após o tempo do bloqueio foi feita uma lavagem com PBS Tween 0,05% adicionado às amostras, o tampão de bloqueio foi utilizado como branco, e feita a curva padrão. A incubação foi feita por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram feitas 5 lavagens com o PBS Tween 0,05% e adicionado o anticorpo de detecção diluído, e incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

Decorrido o tempo, foram feitas 5 lavagens com PBS Tween 0,05% e adicionada HRP diluída e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foram feitas 7 lavagens com o PBS Tween 0,05% e adicionado o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) por 15 minutos, e a reação foi parada por Ácido Sulfúrico 2N. A leitura foi realizada a 450 nm e em 570 nm. Os resultados foram calculados com a utilização de curva padrão e as absorbâncias obtidas em cada amostra. Para a IL-1 β o limite de detecção foi de 15,62 $\mu\text{g/mL}$. Estes experimentos foram realizados oito vezes.

7.2. ELISA IL-6 e TNF- α

Utilizou-se uma placa de 96 *wells* cuja sensibilização foi feita com incubação *overnight* a 4 °C do anticorpo de captura diluído em tampão de fosfato de sódio 0.2 M para IL-6 e tampão de carbonato 0.1 M para TNF- α . Foram feitas 3 lavagens com PBS Tween 0,05% e o bloqueio com a solução de bloqueio (PBS 10% Soro Fetal Bovino, pH: 7) por uma hora em temperatura ambiente, essa solução foi utilizada como diluente para a solução de *working detector*. Após o tempo do bloqueio foram feitas três lavagens com PBS Tween 0,05% e a proteína recombinante para a curva padrão foi reconstituída a 4000 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as citocinas. Adicionou-se às amostras, o tampão de bloqueio foi utilizado como branco, e feita a curva padrão. A incubação foi feita por 2 horas em temperatura ambiente. A solução de *working detector* (anticorpo de detecção e estreptavidina peroxidase) foi feita 15 minutos antes do término da incubação. Posteriormente, foram feitas cinco lavagens com o PBS Tween 0,05% e adicionado à solução *working detector* sendo incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

Decorrido o tempo, foram feitas sete lavagens com PBS Tween 0,05% e adicionado o substrato TMB por 30 minutos, e a reação foi parada por Ácido Sulfúrico 2N. A leitura foi realizada a 450 nm e a 570 nm. Os resultados foram calculados com a

utilização de curva padrão e as absorbâncias obtidas em cada amostra. O limite de detecção foi de 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Estes experimentos foram realizados três vezes.

8. Análise Estatística

Os experimentos de citotoxicidades (MTT) foram submetidos à análise utilizando-se do teste T-student, aceitando como diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

Nos experimentos de dosagem de citocinas, os grupos experimentais foram submetidos ao teste de normalidade. Ao não apresentarem distribuição Gaussiana, foram submetidos à análise de variância não paramétrica utilizando-se o teste Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, aceitando como diferenças significativas valores de $p < 0,05$. Sendo representados com **** valores de $p < 0,0001$, com *** valores de $p < 0,001$, com ** valores de $p < 0,01$ e com * valores de $p < 0,05$. Os testes foram feitos utilizando o *software* GraphPad Prism 9.4.1.

RESULTADOS

1. Comparação entre as sublinhagens na liberação de IL-1 β por LPS + ATP

Comprovando-se a diferença descrita entre os animais AIRmáx^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T} foi feita a ativação clássica da via do inflamassoma por LPS (1 μ g/mL) por 4 horas e ATP (5mM) por 1 hora. A citocina foi dosada por ELISA no sobrenadante dos BMDMs.

Ao avaliar a liberação de IL-1 β , comparamos a diferença entre as sublinhagens dos camundongos. Observa-se a distinção entre a linhagem AIRmáx e AIRmin, cuja diferença significativa entre esses animais como o genótipo C/C foi de um valor $p < 0,01$ (Figura 9).

Ao avaliar a variação entre o genótipo C/C com o T/T, dentro da mesma linhagem, ocorre uma diferença significativa de $p < 0,05$. Enquanto a diferença de genótipo associada com a da linhagem AIRmáx^{C/C} e AIRmin^{T/T}, há uma significância de $p < 0,0001$ (Figura 9). Desta forma, pode-se concluir que os animais AIRmáx e AIRmin apresentam distinção na ativação da via do inflamassoma, sendo mais evidente ao compararmos o polimorfismo dentro da sublinhagem.

Liberação de IL-1 β por estimulação de LPS + ATP

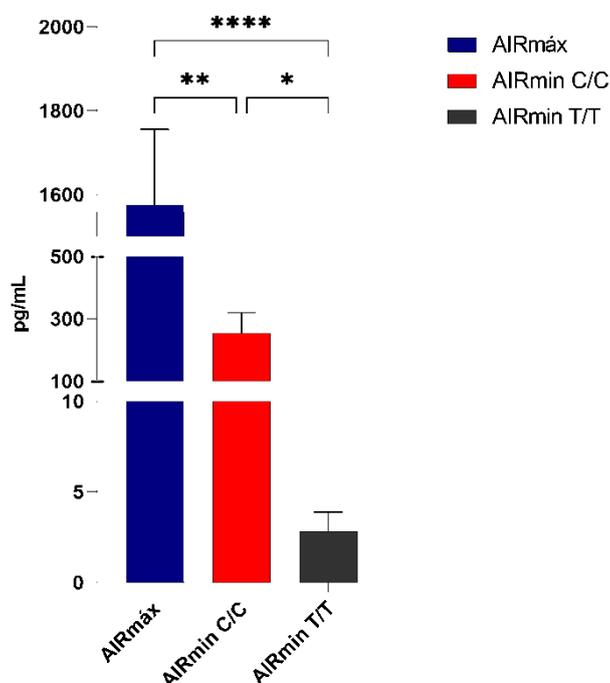


Figura 9. Liberação de IL-1 β por estimulação LPS + ATP. Quantificação da liberação de IL-1 β em macrófagos (BMDMs) das linhagens AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T após a estimulação com LPS (1 μ g/mL) por 3 horas e ATP (5mM) por 1h. Resultados expressos em média (pg/mL) \pm EP. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e **** $p < 0,0001$

2. Ensaio de viabilidade celular com ativação por BJV e TsV em macrófagos de camundongos AIRmáx^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}

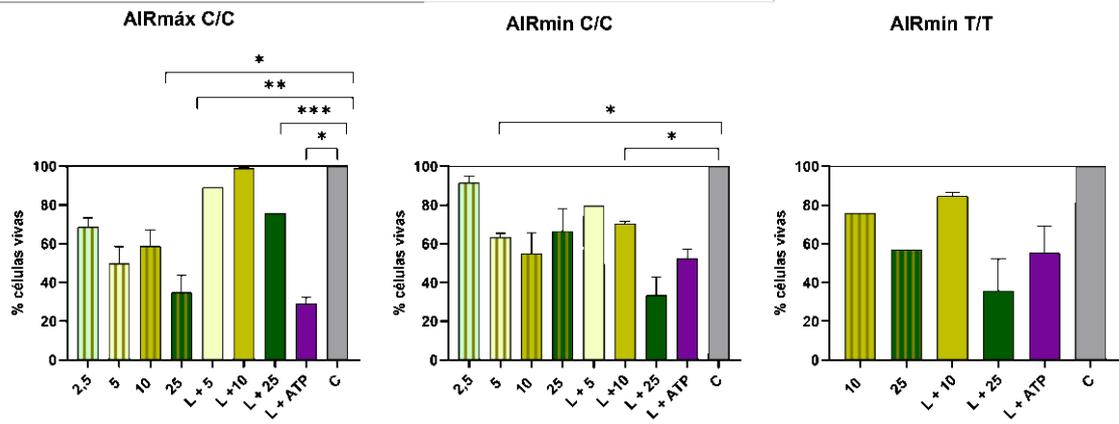
Avaliou-se a sobrevivência das células, visando escolher as concentrações que seriam utilizadas na ativação celular. Os animais AIRmin^{T/T} não foram submetidos a todas as concentrações, devido a sua baixa taxa de reprodução, sendo uma sublinhagem mais sensível e com menor quantidade de animais, assim faz-se necessário a utilização de menos animais para que a sublinhagem seja mantida.

Desta forma, a partir dos resultados obtidos escolhemos as concentrações que manteriam uma sobrevivência celular. Assim o BJV teve as concentrações de 5, 10 e 25 µg/mL escolhidas. Descartou-se a dosagem de 2,5 µg/mL que apesar de apresentar uma sobrevivência elevada foi considerada muito baixa, não apresentando diferença estatística para nenhum dos animais. Para o animal AIRmáx foi vista diferença estatística nas concentrações de 25 e 10 µg/mL e na associação do LPS + 25 µg/mL, em relação ao controle positivo de sobrevivência celular (C – 100%). Por outro lado, no animal AIRmin^{C/C} apresentou diferença estatística entre o BJV na concentração de 5 µg/mL e LPS + 10 µg/mL, em relação ao controle de sobrevivência celular (C – 100%) (Figura 10 A).

Para o TsV, as concentrações escolhidas foram de 10, 25 e 50 µg/mL, descartando-se a concentração de 5 µg/mL devido sua similaridade de resposta com a concentração de 10 µg/mL. Diferenças estatísticas só foi observada no animal AIRmáx, sendo vista em todas as concentrações do veneno utilizadas e do LPS + 10 µg/mL do TsV, em relação ao controle positivo de sobrevivência celular (C – 100%) (Figura 10.B).

Ao comparar a citotoxicidade do veneno da *B. jararaca* em relação ao *T. serrulatus*, obteve-se diferença estatística comparando-se todas as dosagens. Demonstrando que o veneno bruto da *B. jararaca* apresenta uma citotoxicidade maior em relação ao do *T. serrulatus* (Figura 11).

A. Ensaio de viabilidade celular com veneno de *B. jararaca*



B. Ensaio de viabilidade celular com veneno de *T. serrulatus*

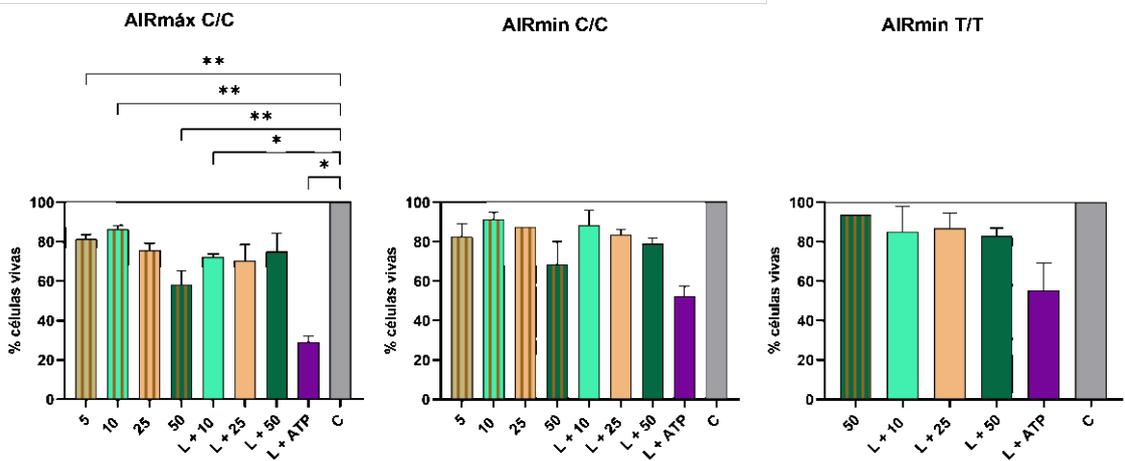


Figura 10. Viabilidade celular em macrófagos pelos venenos. Ensaio de viabilidade celular (MTT) pelo estímulo do veneno da *B. jararaca* ($\mu\text{g/mL}$), LPS + Bjv e LPS + ATP nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T (A) e pelo veneno *T. serrulatus* ($\mu\text{g/mL}$), LPS + TsV e LPS + ATP (B). L = LPS; C = Controle negativo. Resultados expressos em média das porcentagens de sobrevivência celular \pm EP. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Comparação de citotoxicidades entre o veneno de *B. jararaca* e o *T. serrulatus*

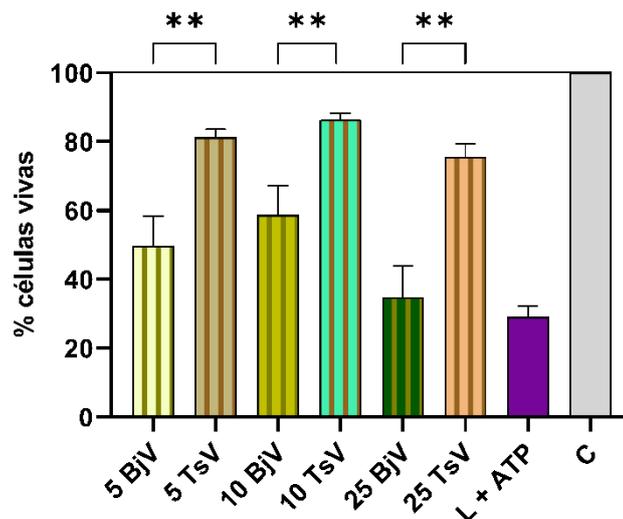


Figura 11. Relação de citotoxicidade entre o veneno da *B. jararaca* e *T. serrulatus*. Comparação do ensaio de viabilidade celular MTT entre as concentrações de 5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$ dos venenos da *B. jararaca* e *T. serrulatus*. L = LPS; C = Controle negativo. Resultados expressos em média das porcentagens de sobrevivência celular \pm EP. ** $p < 0,01$

3. Liberação de IL-1 β por estimulação por BjV em macrófagos

Para a avaliação de liberação de IL-1 β foi coletado o sobrenadante das células após serem estimuladas pelo veneno da *B. jararaca* e a citocina dosada por ELISA.

Nos animais AIRmáx, em seu primeiro gráfico é possível observar a importância do uso BjV como um segundo sinal para ativação da via inflamassoma. Uma vez que a utilização apenas do veneno não estimulou o inflamassoma. Desta forma, o primeiro sinal realizado pela incubação com LPS por 4 horas seguido do segundo sinal, o veneno em suas diferentes dosagens, gerou a liberação significativa de IL-1 β quando comparadas com apenas o estímulo do veneno, para as concentrações de 10 e 25 μ g/mL ($p < 0,0001$). Quando analisado o controle positivo (LPS+ATP), da via clássica de ativação do inflamassoma, observou-se uma diferença significativa para todos os controles (Figura 11.A.a; Tabela 1).

No segundo gráfico dos animais AIRmáx foi feita a análise entre os controles e o estímulo com o veneno, e entre as diferentes dosagens dos venenos. Observando-se diferença entre os estímulos com o veneno e o controle negativo, sendo que com o estímulo de LPS por 4 horas seguido do veneno de BjV 5 μ g/mL e 10 μ g/mL, apresentou uma pequena diferença ($p < 0,05$). Enquanto com o LPS seguido de BjV 25 μ g/mL, uma diferença sugestiva da liberação de IL-1 β , além de não apresentar uma diferença com o controle positivo (Figura 11.A.b; Tabela 1).

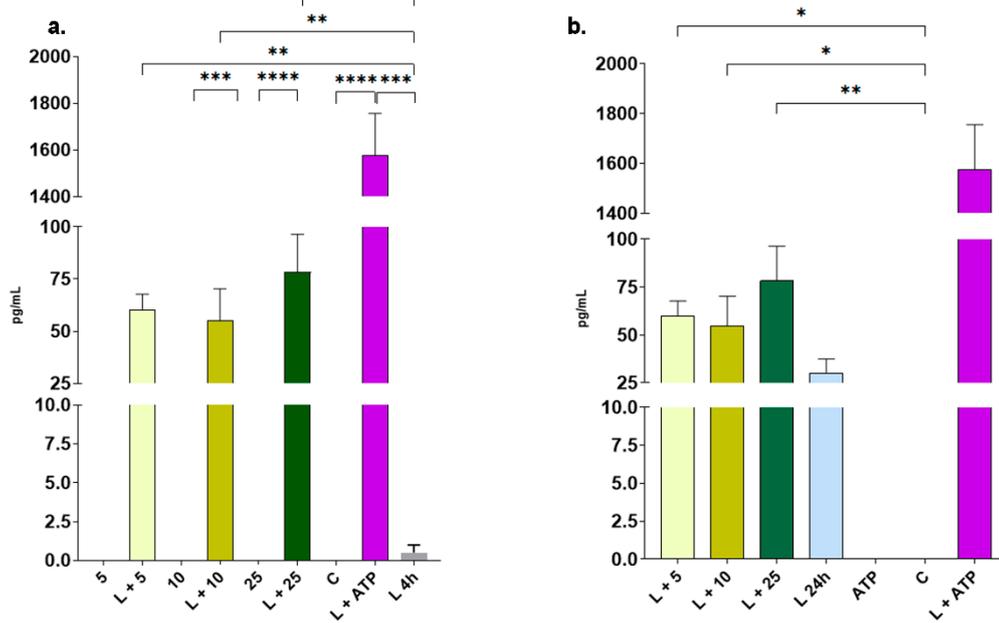
Nos animais AIRmin^{C/C} foi observado uma diferença significativa entre os controles, demonstrando a ativação da via. No entanto, não houve diferença significativa entre a liberação de IL-1 β apenas com o veneno e com o de LPS por 4 horas e seguido do veneno (Figura 12.B.a, Tabela 1).

Quando feita a ativação dos macrófagos do AIRmin^{C/C} pelo veneno de BjV, observado no segundo gráfico, nota-se uma diferença entre todos os estímulos e a ativação da via clássica. Sendo a dosagem de 25 μ g/mL do veneno com menor diferença do LPS + ATP ($p < 0,05$) (Figura 12.B.b; Tabela 1).

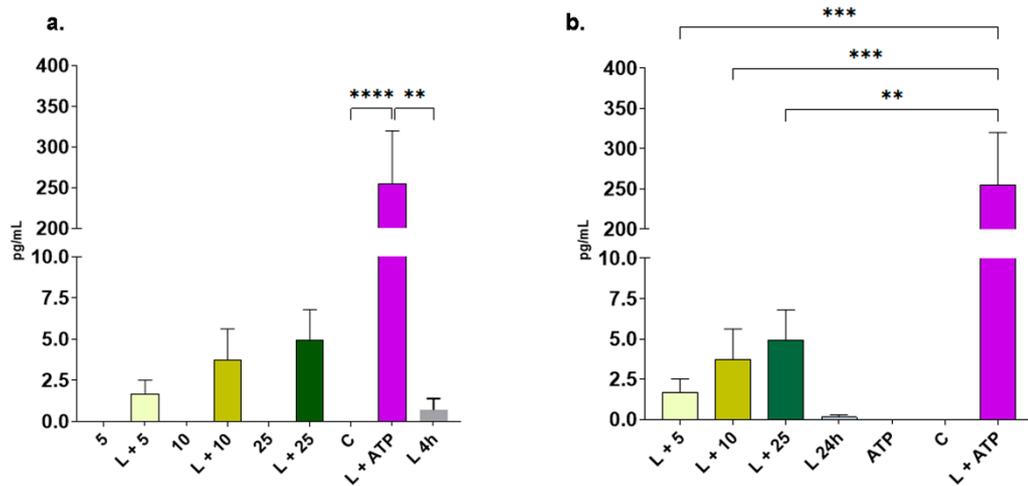
Os animais AIRmin^{T/T}, que apresentam o alelo de baixa resposta do gene *PYCARD*, possuem uma liberação de IL-1 β muito reduzida. Ao analisar o primeiro gráfico nota-se leve diferença significativa ($p < 0,05$) pela ativação dos macrófagos por LPS + ATP em relação ao controle (Figura 12.C.a; Tabela 1). Além disso, a estimulação com apenas o veneno e a associação do LPS + veneno não gerou diferença significativa.

Liberação de IL-1 β por estímulo do BjV e LPS + BjV

A. AIRmáx C/C



B. AIRmin C/C



C. AIRmin T/T

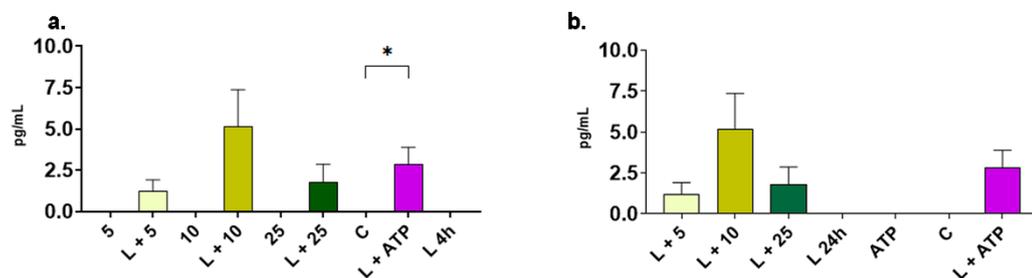


Figura 12. **Liberação de IL-1 β pelo veneno *B. jararaca*.** Dosagem de IL-1 β pela ativação de veneno BjV nas concentrações de 5 μ g/mL, 10 μ g/mL e 25 μ g/mL por 4 horas, LPS (1 μ g/mL) por 4 horas associado ao veneno BjV nas dosagens de 5 μ g/mL, 10 μ g/mL e 25 μ g/mL por 24h e LPS (1 μ g/mL) + ATP (5mM) e os controle e LPS 1 μ g/mL por 4h, nos animais AIRmáx (A.a), AIRmin C/C (B.a), e AIRmin T/T (C.a); e pelo estímulo do LPS (1 μ g/mL) por 4 horas associado ao veneno BjV nas concentrações de 5 μ g/mL, 10 μ g/mL e 25 μ g/mL por 24h e LPS (1 μ g/mL) + ATP (5mM) e os controle e LPS 1 μ g/mL por 4h, nos animais AIRmáx (A.b), AIRmin C/C (B.b), e AIRmin T/T (C.b). L = LPS; C = Controle Negativo; L 4h, L 24h e ATP = Controles experimentais; L + ATP = Controle Positivo. Resultados expressos em média (pg/mL) \pm EP. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,00001.

Ao comparar os controles com o estímulo do veneno da *B. jararaca* associado ao LPS, visto no segundo gráfico não é observado nenhuma diferença significativa (Figura 11.C.b; Tabela 1). Vale ressaltar que o limite de detecção do ensaio de ELISA utilizado é de 15 pg/ml, sendo, portanto, os resultados menores que este valor, observado nos animais AIRmin é relativo a uma liberação irrelevante de IL-1 β .

Tabela 1. Avaliação da produção de IL-1 β em macrófagos, derivados de células da medula óssea, estimulados por BjV, LPS + BjV, LPS, LPS + ATP e controle

Amostra	AIRmáx		AIRmin C/C		AIRmin T/T	
	IL-1 β pg/mL	n	IL-1 β pg/mL	n	IL-1 β pg/mL	n
5 μ g/mL BjV	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	1	-	0
10 μ g/mL BjV	0.00 \pm 0.00	6	0.00 \pm 0.00	3	0.00 \pm 0.00	2
25 μ g/mL BjV	0.00 \pm 0.00	7	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2
LPS + 5 μ g/mL BjV	60.02 \pm 7.68	7	1.69 \pm 0.83	12	1.20 \pm 0.71	7
LPS + 10 μ g/mL BjV	54.86 \pm 15.42	11	3.72 \pm 1.89	13	5.16 \pm 2.20	11
LPS + 25 μ g/mL BjV	78.30 \pm 18.12	11	4.92 \pm 1.87	11	1.78 \pm 1.07	8
LPS + ATP	1575.49 \pm 180.56	14	254.90 \pm 65.13	12	2.84 \pm 1.05	11
LPS 24h	30.06 \pm 7.36	14	0.14 \pm 0.14	11	0.00 \pm 0.00	9
LPS 4h	0.5 \pm 0.5	4	0.70 \pm 0.70	4	0.00 \pm 0.00	4
ATP	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2
CONTROLE	0.00 \pm 0.00	10	0.00 \pm 0.00	13	0.00 \pm 0.00	10

4. Comparação entre as sublinhagens AIR na liberação de IL-1 β pela ativação celular com BjV

Ao ser feita a comparação entre os animais AIRmáx^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}. Observou-se a manutenção do padrão visto pela ativação clássica. Em que os animais AIRmáx apresentaram maior liberação pelo estímulo da associação entre LPS seguido do veneno da *B. jararaca* em suas diferentes concentrações (Tabela 1).

Ao comparar os animais com o mesmo genótipo em linhagens diferentes foi observado uma diferença estatística de $p < 0,01$ para todas as concentrações do veneno. Ao comparar os animais com diferente genótipo e linhagem, nas dosagens de 5 μ g/mL e 10 μ g/mL ocorreu uma diferença significativa ($p < 0,05$) e em 25 μ g/mL essa diferença foi acentuada ($p < 0,01$). Por fim, os animais da linhagem AIRmin com diferente genótipo, não apresentaram diferença estatística. Esses animais secretam níveis muito baixos de IL-1 β no limite de detecção do teste utilizado (Figura 13).

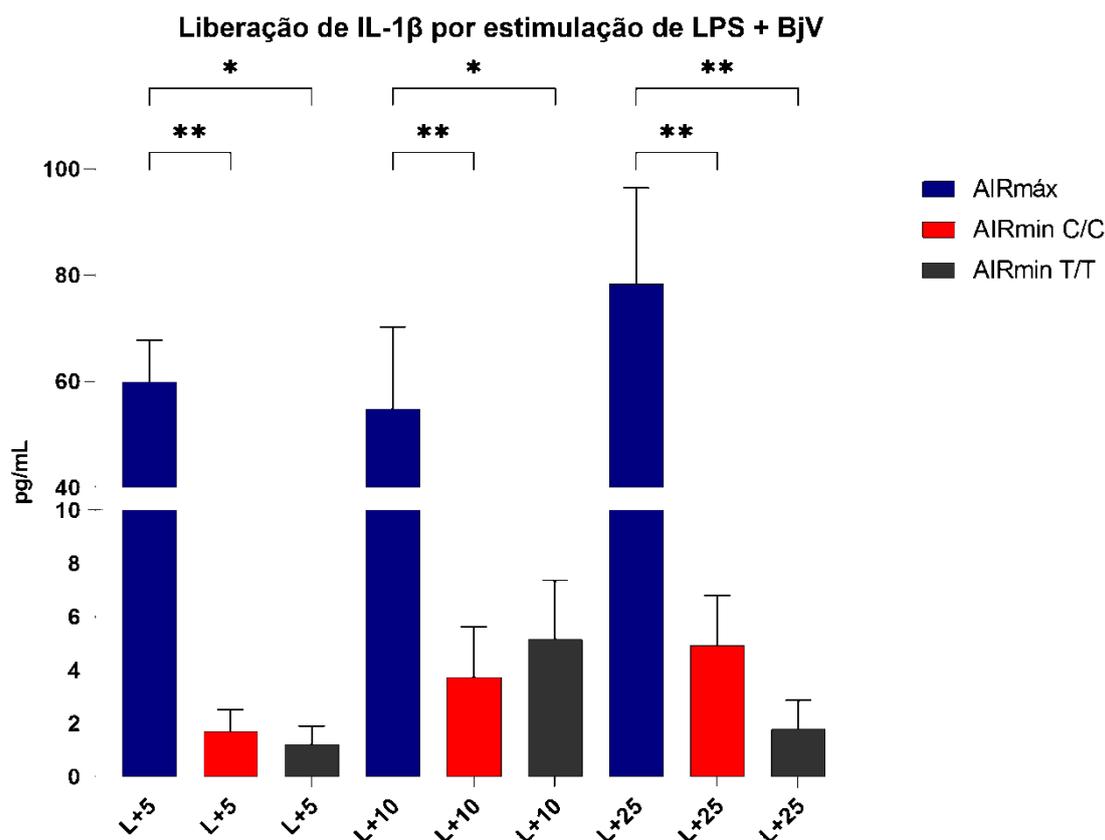


Figura 13. **Liberção de IL-1 β pelo LPS + BjV.** Dosagem de IL-1 β pela ativação de LPS (1 μ g/mL) por 4 horas associado ao veneno *B. jararaca* nas dosagens de 5 μ g/mL, 10 μ g/mL e 25 μ g/mL nos animais AIRmáx, AIRmin C/C, e AIRmin T/T. L = LPS; Resultados expressos em média (pg/mL) \pm EP. * p < 0,05 e ** p < 0,01.

5. Análise da ativação da via do inflamassoma NLRP3 pelo veneno da *B. jararaca*

Para a avaliar a ocorrência da ativação da via do inflamassoma NLRP3 pelo BjV utilizou-se o inibidor específico MCC 950 (10 μ M). Nos animais AIRmáx^{C/C} e AIRmin^{C/C} observa-se a diferença significativa em comparação ao controle positivo (p < 0,05), indicando que o inibidor nessa concentração bloqueia a formação do inflamassoma inibindo a liberação de IL-1 β . No entanto, nos animais AIRmáx, a inibição foi significativa no grupo LPS + 10 μ g/mL de BjV (Figura 14; Tabela 2). Enquanto na concentração de 25 μ g/mL de BjV não observamos a inibição pelo MCC 950, sendo uma das possíveis explicações a disputa pelo sítio de ligação do receptor, apresentando uma maior quantidade de veneno em relação ao inibidor, não conseguindo ocorrer a inibição.

Tabela 2. Avaliação da inibição do NLRP3 pela produção de IL-1 β em macrófagos por MCC 950

Amostra	AIRmáx		AIRmin C/C		AIRmin T/T	
	IL-1 β $\mu\text{g/mL}$	n	IL-1 β $\mu\text{g/mL}$	n	IL-1 β $\mu\text{g/mL}$	n
MCC 950 + LPS + 10 $\mu\text{g/mL}$ BjV	1.85 \pm 1.30	5	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2
LPS + 10 $\mu\text{g/mL}$ BjV	54.86 \pm 15.42	11	3.72 \pm 1.89	13	5.16 \pm 2.20	11
MCC 950 + LPS + 25 $\mu\text{g/mL}$ BjV	54.91 \pm 25.55	4	9.63 \pm 4.84	3	5.74 \pm 3.59	4
LPS + 25 $\mu\text{g/mL}$ BjV	78.30 \pm 18.12	11	4.92 \pm 1.87	11	1.78 \pm 1.07	8
MCC 950 + LPS + ATP	2.51 \pm 2.51	2	5.34 \pm 2.75	2	0.00 \pm 0.00	1
LPS + ATP	1575.49 \pm 180.56	14	254.90 \pm 65.13	12	2.84 \pm 1.05	11
CONTROLE	0.00 \pm 0.00	10	0.00 \pm 0.00	13	0.00 \pm 0.00	10

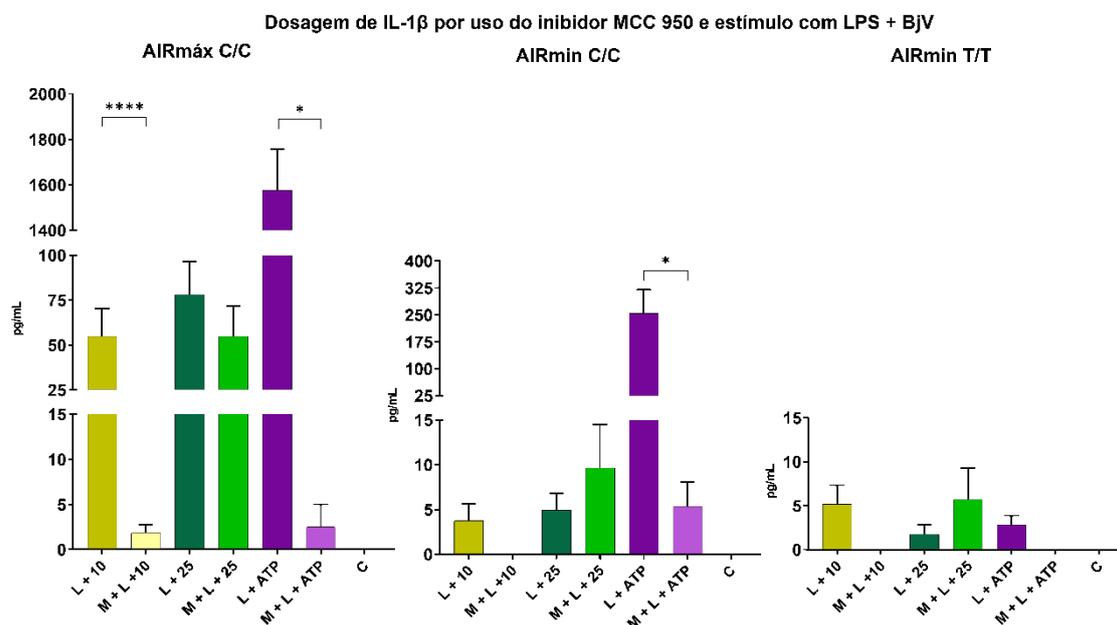


Figura 14. Liberação de IL-1 β pelo LPS + BjV após o tratamento com o inibidor de NLRP3. Dosagem de IL-1 β pela inibição do NLRP3 utilizando MCC 950 (10 μM) por 1h, seguido de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas associado ao veneno *B. jararaca* nas dosagens de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas e por LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas associado ao veneno *B. jararaca* por 24 horas nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T. L = LPS; M = MCC 950; C = Controle; L + ATP = Controle Positivo; M + L + ATP = Controle de inibição pelo MCC 950; Resultados expressos em média ($\mu\text{g/mL}$) \pm EP. * $p < 0,05$ e **** $p < 0,00001$.

6. Liberação de IL-1 β por estimulação por TsV em macrófagos

Para a avaliação de liberação de IL-1 β foi coletado o sobrenadante das células após serem estimuladas por TsV e a citocina dosada por ELISA, sendo feita uma relação com a curva padrão.

Nos animais AIRmáx, foi feita a comparação entre o estímulo apenas com o veneno e com o LPS + TsV. Observando-se a necessidade de um segundo sinal para a ativação da via. Desta forma, o estímulo para 10 μ g/mL TsV apresentou uma diferença significativa ($p < 0,05$), enquanto para a 25 μ g/mL e 50 μ g/mL ocorreu uma diferença estatística significativamente mais acentuada ($p < 0,0001$), sendo a mesma ao comparar o LPS + ATP com o controle negativo. Todos os estímulos com LPS foram significativamente diferentes do LPS 4h ($p < 0,0001$) (Figura 15.A.a; Tabela 3).

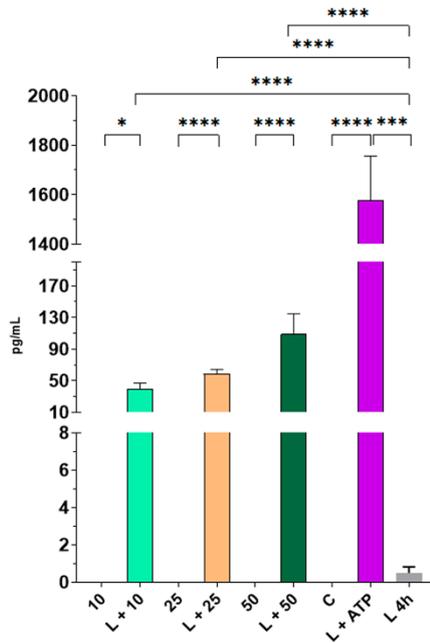
Ao comparar os estímulos e os controles, os tratamentos com LPS seguido com o veneno de *T. serrulatus* em suas dosagens para os animais AIRmáx apresentaram diferença significativa para as concentrações de 25 μ g/mL e 50 μ g/mL ($p < 0,0001$). Enquanto o controle positivo foi significativamente diferente do LPS + TsV 10 μ g/mL ($p < 0,01$) (Figura 15.A.b; Tabela 3).

Nos animais AIRmin^{C/C}, ao comparar os estímulos com e sem LPS, não ocorreu diferença significativa (Figura 15.B.a; Tabela 3). Quando os estímulos foram comparados com o controle positivo (LPS+ATP) e negativo, observa-se maior semelhança com o controle negativo, e diferença estatística com o positivo (Figura 15.B.b).

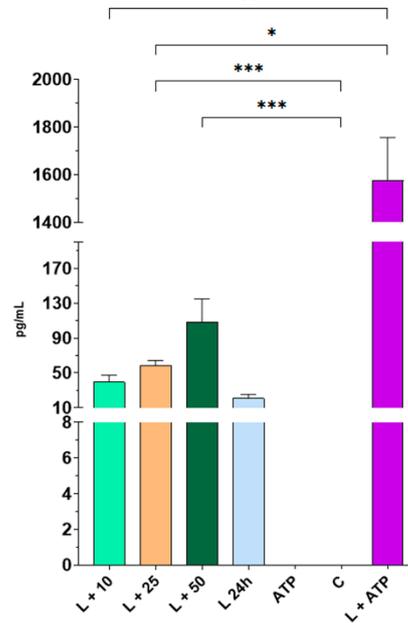
Os animais AIRmin^{T/T}, apresentaram diferença estatística entre o controle positivo e o controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 15.C.a; Tabela 3). No segundo gráfico o LPS + ATP foi significativamente diferente das ativações com LPS + 25 μ g/mL e LPS + 50 μ g/mL ($p < 0,05$) (Figura 15.C.b; Tabela 3). Esses animais secretam níveis muito baixos de IL-1 β no limite de detecção do teste utilizado.

Liberação de IL-1 β por estímulo do TsV e LPS + TsV

A. AIRmáx C/C

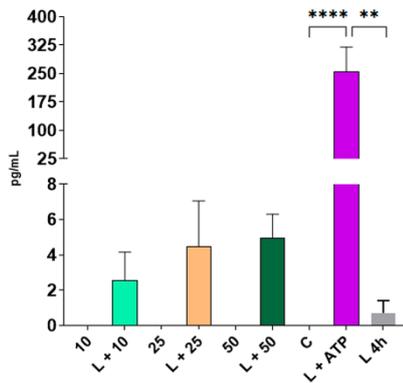


b.

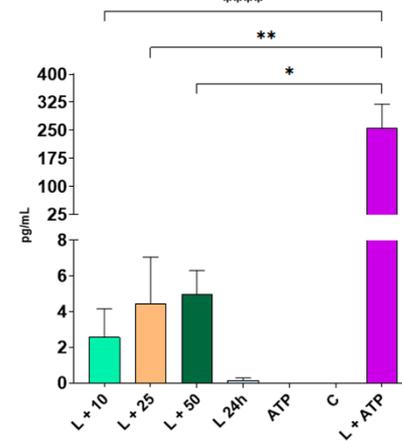


B. AIRmin C/C

a.

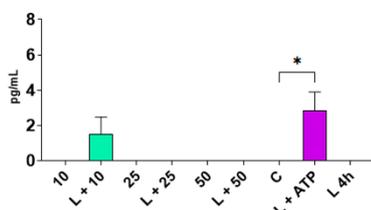


b.



C. AIRmin T/T

a.



b.

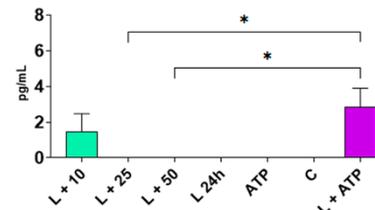


Figura 15. Liberação de IL-1 β pelo veneno *T. serrulatus*. Dosagem de IL-1 β pela ativação de veneno TsV nas concentrações de 10 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL por 4 horas, LPS (1 μ g/mL) por 4 horas associado ao veneno TsV nas dosagens de 10 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL por 24h e LPS (1 μ g/mL) + ATP (5mM) e os controle e LPS 1 μ g/mL por 4h, nos animais AIRmáx (A.a), AIRmin C/C (B.a), e AIRmin T/T (C.a); e pelo estímulo do LPS (1 μ g/mL) por 4 horas associado ao veneno TsV nas dosagens de 10 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL por 24h e LPS (1 μ g/mL) + ATP (5mM) e os controle e LPS 1 μ g/mL por 4h, nos animais AIRmáx (A.b), AIRmin C/C (B.b), e AIRmin T/T (C.b); L = LPS; C = Controle; L4h, L24h e ATP = Controle experimentais; L + ATP = Controle Positivo. Resultados expressos em média (pg/mL) \pm EP. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,00001.

Tabela 3. Avaliação da produção de IL-1 β em macrófagos, estimulados por TsV, LPS + TsV, LPS, LPS + ATP e controle

Amostra	AIRmáx		AIRmin C/C		AIRmin T/T	
	IL-1 β μ g/mL	n	IL-1 β μ g/mL	n	IL-1 β μ g/mL	n
10 μ g/mL TsV	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2	-	-
25 μ g/mL TsV	0.00 \pm 0.00	6	0.00 \pm 0.00	4	0.00 \pm 0.00	2
50 μ g/mL TsV	0.00 \pm 0.00	6	0.00 \pm 0.00	4	0.00 \pm 0.00	
LPS + 10 μ g/mL TsV	36.60 \pm 7.61	11	2.56 \pm 1.59	14	1.49 \pm 0.99	8
LPS + 25 μ g/mL TsV	58.62 \pm 5.56	15	4.45 \pm 2.60	13	0.00 \pm 0.00	10
LPS + 50 μ g/mL TsV	108.60 \pm 26.06	13	4.95 \pm 1.35	13	0.00 \pm 0.00	10
LPS + ATP	1575.49 \pm 180.56	14	254.90 \pm 65.13	12	2.84 \pm 1.05	11
LPS 24h	20.80 \pm 4.40	12	0.14 \pm 0.14	11	0.00 \pm 0.00	9
LPS 4h	0.50 \pm 0.50	4	0.70 \pm 0.70	4	0.00 \pm 0.00	4
ATP	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2
CONTROLE	0.00 \pm 0.00	10	0.00 \pm 0.00	13	0.00 \pm 0.00	10

7. Comparação entre as sublinhagens AIR na liberação de IL-1 β pela ativação celular com TsV

A liberação de IL-1 β pelo estímulo do LPS por 4 horas, seguido por diferentes concentrações do veneno de *T. serrulatus* por 24 horas em cada sublinhagem foi dosada por ELISA.

Ao comparar as linhagens com mesmo genótipo (AIRmáx^{C/C} com AIRmin^{C/C}), nota-se diferença significativa entre elas, sendo nos estímulos de LPS + 10 μ g/mL e LPS + 50 μ g/mL ($p < 0,01$) e para LPS + 25 μ g/mL ($p < 0,001$) (Figura 16).

Analisando a segregação do genótipo dentro da linhagem AIRmin não ocorreu significância estatística. Por fim, comparando-se os animais AIRmáx^{C/C} com AIRmin^{T/T}, analisando a distinção da linhagem e do genótipo do gene *PYCARD*, ocorre diferença estatística entre LPS + 25 μ g/mL e LPS + 50 μ g/mL ($p < 0,0001$), e para LPS + 10 μ g/mL ($p < 0,05$) (Figura 16).

Liberação de IL-1 β por estimulação de LPS + TsV

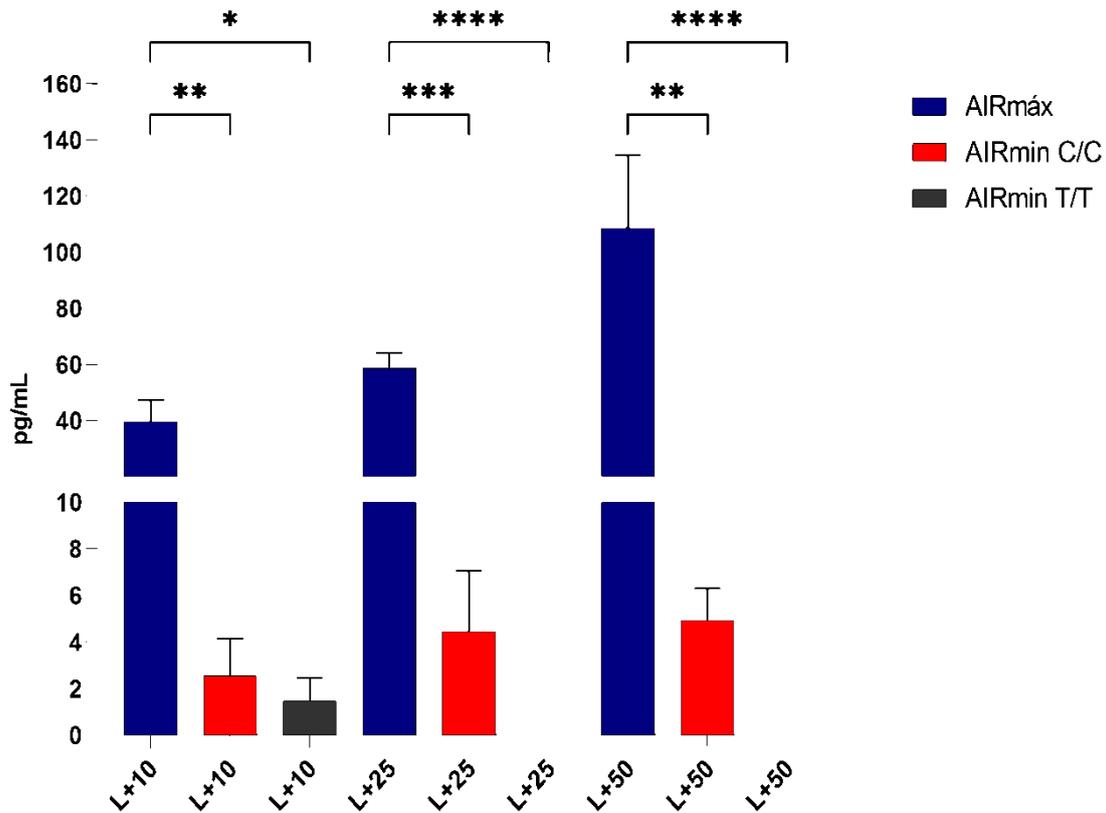


Figura 16. Liberação de IL-1 β pelo LPS + TsV. Dosagem de IL-1 β pela ativação de LPS (1 μ g/mL) por 4 horas associado ao veneno *T. serrulatus* nas dosagens de 10 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T. L = LPS; Resultados expressos em média (pg/mL) \pm EP. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,00001.

8. Análise da ativação da via do inflamassoma NLRP3 pelo veneno da *T. serrulatus*

Buscando identificar se o TsV utiliza a via do inflamassoma NLRP3 foi utilizado o inibidor deste receptor, MCC 950, uma hora antes do estímulo do LPS nos macrófagos de cada linhagem. O sobrenadante foi coletado após o período de ativação e a presença de IL-1 β foi quantificada por ELISA.

Nos animais AIRmáx foi observada uma diminuição na liberação da citocina onde ocorreu a inibição do receptor NLRP3 em todas as concentrações do veneno utilizadas (Figura 17; Tabela 4). Para a concentração de 25 e 10 μ g/mL ocorreu uma diferença significativa (p < 0,05), e na concentração de 50 μ g/mL o LPS+ATP essa diferença foi maior (p < 0,0001).

Nos animais AIRmin^{C/C} o mesmo fenômeno foi observado para inibição das amostras que receberam LPS+ATP e para a concentração de 25 µg/mL, (p < 0,05). Enquanto nos AIRmin^{T/T} não foi vista diferença estatística. No entanto, deve ser levado em consideração o alelo TT do gene Pycard nesses animais, fazendo-os liberar quantias mínimas de IL-1β.

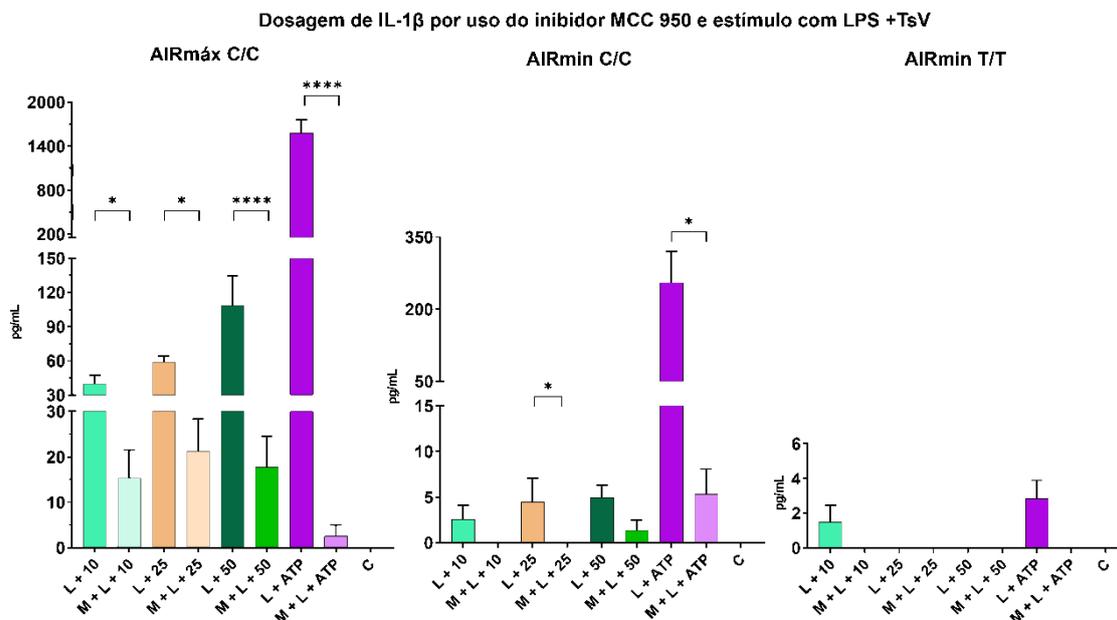


Figura 17. **Liberação de IL-1β pelo LPS + B_jV após o tratamento com o inibidor de NLRP3.** Dosagem de IL-1β pela inibição do NLRP3 utilizando MCC 950 (10µM) por 1h, seguido de LPS (1µg/mL) por 4 horas associado ao veneno *T. serrulatus* nas dosagens de 10 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL por 24 horas e por LPS (1µg/mL) por 4 horas associado ao veneno *T. serrulatus* por 24 horas nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T. L = LPS; M = MCC 950; C = Controle; L + ATP = Controle Positivo; M + L + ATP = Controle da inibição pelo MCC 950; Resultados expressos em média (pg/mL) ±

Tabela 4. Avaliação da inibição do NLRP3 pela produção de IL-1 β em macrófagos, por MCC 950

Amostra	AIRmáx		AIRmin C/C		AIRmin T/T	
	IL-1 β $\mu\text{g/mL}$	n	IL-1 β $\mu\text{g/mL}$	n	IL-1 β $\mu\text{g/mL}$	n
MCC + LPS + 10 $\mu\text{g/mL}$ TsV	15.38 \pm 6.18	7	0.00 \pm 0.00	7	0.00 \pm 0.00	5
LPS + 10 $\mu\text{g/mL}$ TsV	36.60 \pm 7.61	11	2.56 \pm 1.59	14	1.49 \pm 0.99	8
MCC + LPS + 25 $\mu\text{g/mL}$ TsV	21.25 \pm 7.06	7	0.00 \pm 0.00	8	0.00 \pm 0.00	6
LPS + 25 $\mu\text{g/mL}$ TsV	58.62 \pm 5.56	15	4.45 \pm 2.60	13	0.00 \pm 0.00	10
MCC + LPS + 50 $\mu\text{g/mL}$ TsV	17.74 \pm 6.72	7	1.35 \pm 1.13	7	0.00 \pm 0.00	6
LPS + 50 $\mu\text{g/mL}$ TsV	108.60 \pm 26.06	13	4.95 \pm 1.35	13	0.00 \pm 0.00	10
MCC + LPS + ATP	2.51 \pm 2.51	2	5.34 \pm 2.75	2	0.00 \pm 0.00	1
LPS + ATP	1575.49 \pm 180.56	14	254.90 \pm 65.13	12	2.84 \pm 1.05	11
CONTROLE	0.00 \pm 0.00	10	0.00 \pm 0.00	13	0.0 0.00	10

9. Verificação da utilização do receptor P2X7 pelo TsV

Para analisar se o veneno interage com receptor P2X7, responsável pelo desencadeamento do segundo sinal via ATP, foi utilizado o inibidor A9736 uma hora antes do estímulo com o TsV em suas diferentes concentrações e dosado a liberação de IL-1 β por ELISA. Não foi observada nenhuma diferença estatística em nenhuma das linhagens, incluindo ao controle da inibição. Não ficando claro a ação desse receptor para esse veneno (Figura 18; Tabela 5).

Dosagem de IL-1 β por uso do inibidor A9736 e estímulo com LPS +TsV

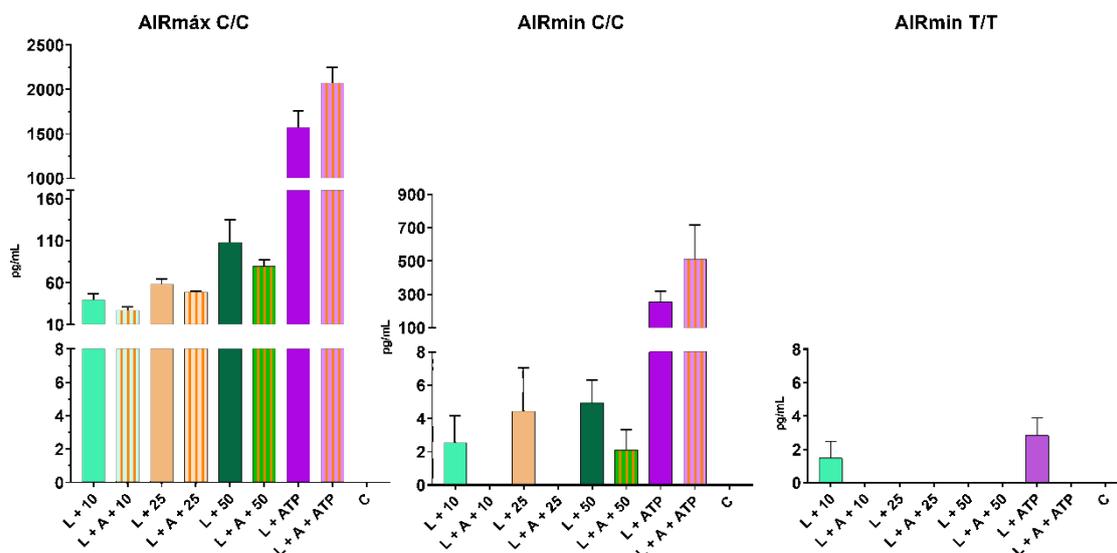


Figura 18. Liberação de IL-1 β pelo LPS + TsV após o tratamento com o inibidor A9736. Dosagem de IL-1 β pela inibição do receptor P2X7 utilizando A9736 (10 μ M) por 1h antes da estimulação do veneno, associado ao estímulo do LPS (1 μ g/mL) por 4 horas associado ao veneno *T. serrulatus* nas dosagens de 10 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL por 24 horas nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T. L = LPS; A = A9736; C = Controle; L + ATP = Controle Positivo; L + A + ATP = Controle da inibição pelo A9736; Resultados expressos em média (pg/mL) \pm EP.

Tabela 5. Avaliação da inibição do receptor P2X7 pela produção de IL-1 β em macrófagos, derivados de células da medula óssea, estimulados por LPS + A9736 + TsV, LPS + TsV, LPS + A9736 + ATP, LPS + ATP e controle

Amostra	AIRmáx		AIRmin C/C		AIRmin T/T	
	IL-1 β μ g/mL	n	IL-1 β μ g/mL	n	IL-1 β μ g/mL	n
LPS + A9736 + 10 μ g/mL TsV	27.65 \pm 3.58	3	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2
LPS + 10 μ g/mL TsV	36.60 \pm 7.61	11	2.56 \pm 1.59	14	1.49 \pm 0.99	8
LPS + A9736 + 25 μ g/mL TsV	48.95 \pm 1.42	3	0.00 \pm 0.00	2	0.00 \pm 0.00	2
LPS + 25 μ g/mL TsV	21.25 \pm 7.06	15	4.45 \pm 2.60	13	0.00 \pm 0.00	10
LPS + A9736 + 50 μ g/mL TsV	79.76 \pm 7.33	5	2.09 \pm 1.22	4	0.00 \pm 0.00	4
LPS + 50 μ g/mL TsV	108.60 \pm 26.06	13	4.95 \pm 1.35	13	0.00 \pm 0.00	10
LPS + A9736 + ATP	2077.82 \pm 171.53	6	512.70 \pm 203.28	4	0.00 \pm 0.00	2
LPS + ATP	1575.49 \pm 180.56	14	254.90 \pm 65.13	12	2.84 \pm 1.05	11
CONTROLE	0.00 \pm 0.00	10	0.00 \pm 0.00	13	0.00 \pm 0.00	10

10. Liberação de IL-6 e TNF- α pela estimulação do veneno

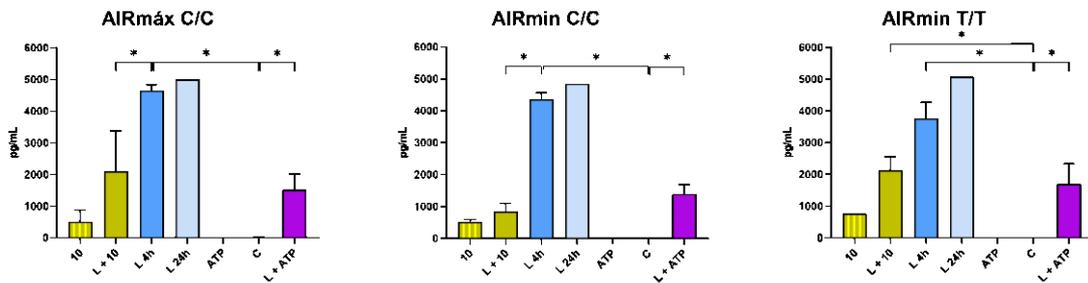
Visando investigar a ativação de outras vias associadas com a resposta inflamatória, foi realizada a dosagem de IL-6 e TNF- α por ELISA nos sobrenadantes dos macrófagos estimulados com os venenos de BjV e TsV.

Para todos os animais foi observado uma liberação de IL-6 após o tratamento com LPS 4h, 24h e LPS + ATP quando comparado com o controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 19). Para o veneno da *B. jararaca* apenas nas células dos camundongos AIRmin^{T/T} pode-se notar uma diferença estatística entre o estímulo com LPS + 10 μ g/mL e o controle negativo (Figura 19.A). Enquanto os animais AIRmáx e AIRmin^{C/C} apresentaram uma redução estatisticamente diferente quando comparados aos grupos LPS + 10 μ g/mL e LPS 24h.

A estimulação com o veneno do *T. serrulatus* apresentou uma redução significativa nas amostras dos animais AIRmáx quando comparado ao grupo LPS + 25 μ g/mL com LPS 4h (Figura 19.B).

A dosagem de TNF- α no sobrenadante do BMDMs após ativação pelo veneno de *B. jararaca* para os animais AIRmáx e AIRmin^{C/C} apresentou diferença estatística entre a concentração do veneno em 10 μ g/mL comparado com o controle negativo ($p < 0,05$) e ao ser comparado com LPS 4h ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 20.A). Por outro lado, apenas a estimulação com o TsV a 25 μ g/mL nas células dos AIRmáx apresentou uma diferença significativa ao controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 20.B).

A. Liberação de IL-6 pelo estímulo do veneno da *B. jararaca*



B. Liberação de IL-6 pelo estímulo do veneno do *T. serrulatus*

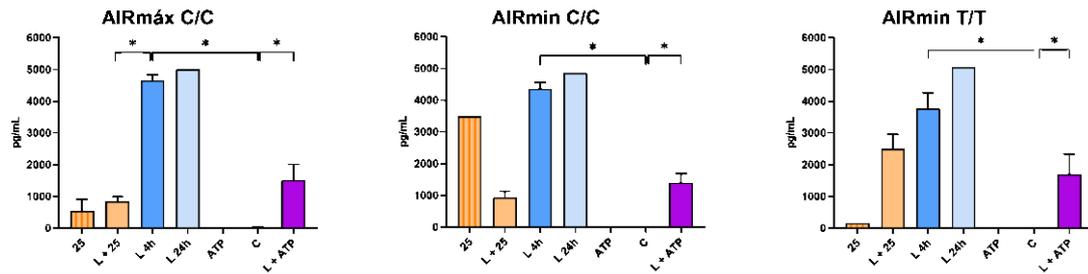
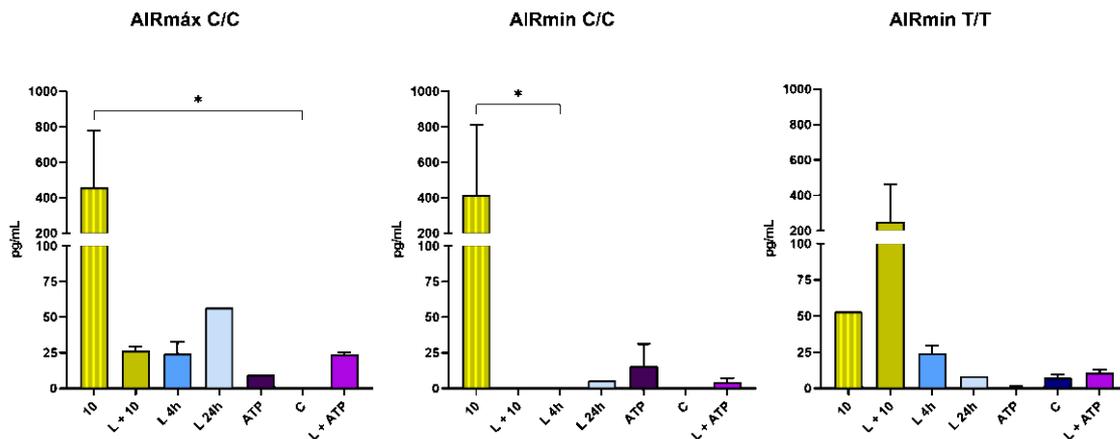


Figura 19. **Liberação de IL-6 pelos venenos BjV e TsV.** Liberação de IL-6 pelo estímulo do veneno da *B. jararaca* na concentração de 10µg/mL, LPS + BjV 10µg/mL, LPS 4h e 24h, ATP, Controle e LPS + ATP nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T (A) e pelo veneno *T. serrulatus* na concentração de 25µg/mL, LPS + TsV 25µg/mL, LPS 4h e 24h, ATP, Controle e LPS + ATP nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T (B). L = LPS; C = Controle. Resultados expressos pela média da liberação de IL-6 em pg/mL ± EP. * p < 0,05.

A. Liberação de TNF- α pelo estímulo do veneno da *B. jararaca*



B. Liberação de TNF- α pelo estímulo do veneno do *T. serrulatus*

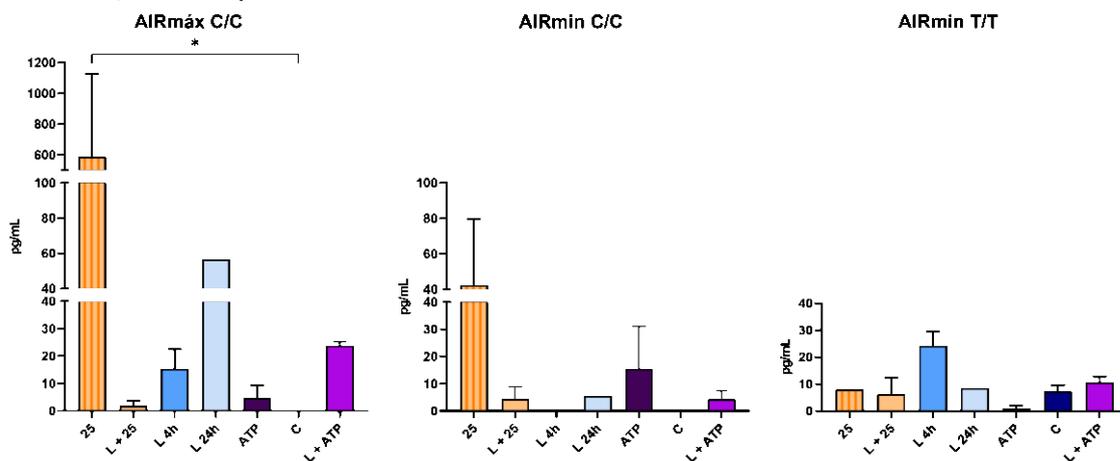


Figura 20. **Liberação de TNF- α pelos venenos BjV e TsV.** Liberação de TNF- α pelo estímulo do veneno da *B. jararaca* na concentração de 10 μ g/mL, LPS + BjV 10 μ g/mL, LPS 4h e 24h, ATP, Controle e LPS + ATP nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T (A) e pelo veneno *T. serrulatus* na concentração de 25 μ g/mL, LPS + TsV 25 μ g/mL, LPS 4h e 24h, ATP, Controle e LPS + ATP nos animais AIRmáx, AIRmin C/C e AIRmin T/T (B). L = LPS; C = Controle. Resultados expressos pela média da liberação de TNF- α em pg/mL \pm EP. * p < 0,05

DISCUSSÃO

Os animais peçonhentos apresentam importância médica mundial. No Brasil, a serpente *Bothrops jararaca* e o escorpião *Tityus serrulatus* são dois dos maiores causadores de acidentes em ampla distribuição nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a, 2022b) Ao compreender os mecanismos que desencadeiam a inflamação pelo veneno desses animais pode-se encontrar novas ferramentas paliativas ou de tratamento.

A utilização de animais laboratoriais que apresentam perfis genotípicos e fenotípicos diferentes facilita o entendimento da relação da via do inflamassoma, um complexo multimérico cuja ativação leva a liberação de IL-1 β e IL-18 e gera a morte celular por piroptose via gasdermina-D, com a atividade inflamatória causada pelo TsV e BjV (SOUZA; STAROBINAS; IBAÑEZ, 2021; ZOCCAL *et al.*, 2014).

Com esse objetivo, este projeto utilizou-se de uma sublinhagem dos animais AIRmáx e AIRmin (IBANEZ *et al.*, 1992), obtidas por seleção genética bidirecional que foram genotipados e acasalados. Esses animais apresentaram um polimorfismo na região do cromossomo 7, no locus Irm-1, no gene *PYCARD* codificador da proteína adaptadora ASC do inflamassoma. A presença de alguns alelos desencadeia uma alteração no processamento das citocinas IL-1 β e IL-18 por essa via, prejudicando sua função. Desta forma, foram produzidas três sublinhagens: AIRmáx^{C/C}, AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T} (BORREGO *et al.*, 2022).

Quando obtido BMDMs desses animais, e estimulados pelo LPS por 4 horas e ATP por 1 hora, a estimulação clássica da via do inflamassoma, nota-se a importância e a manutenção da diferença entre o fundo genético dos animais AIRmáx e AIRmin, mesmo ambos apresentando genótipo C/C do gene *PYCARD*. A associação da diferença do alelo T/T ao fundo genético leva a uma diminuição na liberação de IL-1 β , tornando-a ínfima no AIRmin^{T/T}. Dentro da mesma linhagem, pode-se observar a importância do polimorfismo para esses animais, em que há uma diferença significativa na secreção da citocina pelos animais AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}.

CARNEIRO *et al.*, 2002 mostraram alterações inflamatória locais e sistêmicas, como a produção de IL-6, TNF- α e IFN- γ entre animais AIRmáx e AIRmin após a inoculação do veneno da *B. jararaca in vivo*, em que os animais AIRmáx apresentaram maior susceptibilidade aos efeitos locais. Os mesmos autores, em 2008, observaram uma diferença na geração de citocinas pró-inflamatórias pelo BjV, com maior expressão gênica das citocinas IL-1 β e IL-6 nos animais AIRmáx em relação ao AIRmin no local

de inoculação, e maior presença de IL-6, IL-1 α , TNF- α e IFN- γ no soro desses animais, desencadeando a efeitos sistêmicos (CARNEIRO *et al.*, 2008)

Nos ensaios de viabilidade celular induzidos pelo BjV e TsV, nossos resultados demonstraram uma maior sobrevivência dos macrófagos de animais com o fundo AIRmin em relação aos animais AIRmáx. Nos experimentos *in vivo* a linhagem AIRmáx demonstrou maior sensibilidade aos efeitos locais do BjV (CARNEIRO *et al.*, 2002). Além disso, o uso do veneno total apresenta componentes que desencadeiam dano celular local, sendo assim, um estímulo como segundo sinal, gerando a ativação da via do inflamassoma e levando a morte celular por piroptose, via Gasdermina-D (BODA *et al.*, 2020).

Para a ativação da via do inflamassoma é necessário a presença de dois sinais. Um primeiro sinal reconhecido por TLR, como o LPS, é utilizado para ativar a proteína MyD88 desencadeando a regulação positiva do fator de transcrição nuclear NF- κ B para a expressão do NLRP3. Após a transcrição, é necessária a presença de um segundo sinal, como PAMP, DAMP ou VAMP, levando a ação da via do inflamassoma. Ativando as citocinas IL-1 β e IL-18 e clivando a GSDMD que formará o poro na membrana celular, fazendo com que essas citocinas sejam liberadas para o meio extracelular e ocorrendo a piroptose (MALIK; KANNEGANTI, 2017).

Desta forma, mostramos nesse trabalho que apenas o uso do veneno não leva a ativação do inflamassoma, sendo é necessária a associação do LPS para que ocorra a expressão e transcrição do NLRP3 e a ativação desse pelo veneno, atuando como um segundo sinal.

A estimulação dos macrófagos de animais AIRmáx pelo LPS + BjV nas concentrações de 5, 10 e 25 μ g/mL levaram a uma pequena liberação de IL-1 β . No entanto, os macrófagos dos animais com fundo genético AIRmin apresentaram uma liberação muito baixa nesse estímulo, tendo em vista a sensibilidade do teste. Desta forma, ao comparar o fundo genético dos animais com o mesmo genótipo para o gene *PYCARD* (AIRmáx^{C/C} e AIRmin^{C/C}) nota-se uma diferença estatística acentuada, independente da presença do alelo que se manteve o mesmo. Além disso, as células dos animais com o mesmo fundo genético e genótipos diferentes para o gene (AIRmin^{C/C} e AIRmin^{T/T}), não apresentam diferenças significativas na liberação de IL-1 β . Sugerindo que o fundo genético dos animais AIRmin, caracterizado pela baixa resposta inflamatória, apresenta menor ativação da via do inflamassoma pelo BjV do que nos AIRmáx.

Ao inibir o receptor NLRP3, nota-se uma redução na liberação de IL-1 β apenas na concentração de 10 μ g/mL no animal AIRmáx. Desta forma, não podemos concluir se

o inflamassoma ativado pelo BjV, está associado ao NLRP3. Serão necessários mais experimentos e o uso de outros antagonistas para podermos ter certeza de qual inflamassoma está sendo ativado pelos venenos.

Outro veneno com atividade biológica importante, principalmente pela presença de componentes que alteram canais de sódio, potássio e cálcio é o do *Tityus serrulatus* (PUCCA *et al.*, 2015). ZOCCAL *et al.*, 2014 observaram a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios por esse veneno. Além disso, ao utilizar animais *knockout* para os NLRP3, ASC e Caspase-1/11 não houve a liberação de IL-1 β , sugerindo que o estímulo do TsV levaria a ativação do inflamassoma NLRP3 (ZOCCAL *et al.*, 2018).

Para o veneno do *T. serrulatus*, os animais AIRmáx apresentaram uma liberação significativa de IL-1 β na associação do LPS com TsV 25 μ g/mL e 50 μ g/mL. No entanto, a linhagem AIRmin apresentou uma secreção muito baixa. Ao ser analisada a diferença estatística entre as linhagens, diferentemente do BjV, nota-se a importância do polimorfismo do gene *PYCARD* juntamente com o fundo genético (AIRmáx^{C/C} e AIRmin^{T/T}). Uma possível explicação é a utilização do TsV pela via do inflamassoma NLRP3, pois ao ter seu receptor inibido na linhagem AIRmáx, apresentou uma redução significativa da liberação de IL-1 β .

Visando verificar se o receptor utilizado pelo TsV para acionar essa via é o mesmo utilizado pelo ATP, foi feito o bloqueio do purinoceptor P2X7. No entanto, não foi observada alteração na liberação de IL-1 β por nenhuma das linhagens.

No veneno de escorpião encontra-se a presença de neurotoxinas que levam a alterações em canais iônicos induzindo a secreção de mediadores pró e anti-inflamatórios (PUCCA *et al.*, 2015; ZOCCAL *et al.*, 2014), nossos resultados, principalmente na linhagem AIRmáx, mostram que essas neurotoxinas do veneno podem atuar como um segundo sinal da via do NLRP3 por alterações no fluxo iônico celular, levando a ativação do inflamassoma e gerando a liberação de IL-1 β pelos macrófagos.

Os animais AIRmax e AIRmin foram selecionados para diferenças na resposta inflamatória, além disso para os alelos do gene *PYCARD*, fizemos a dosagem de outras citocinas que não dependem do inflamassoma para observar se outras modificações foram feitas durante a fixação do alelo T/T do gene *PYCARD*. Podemos observar que os fenótipos de inflamação foram mantidos ocorrendo a liberação de IL-6 e TNF- α induzidas tanto pelo BjV como o TsV.

Em resumo, nosso trabalho fornece bases para uma melhor compreensão da inflamação causada pelo BjV e TsV. Nossos dados mostraram que os animais AIRmáx

apresentaram liberação de IL-1 β pelos seus macrófagos, sendo mais susceptíveis aos efeitos inflamatórios. Em contrapartida, o fundo genético AIRmin se mostrou mais resistente ao estímulo dos venenos, induzindo uma baixa secreção de IL-1 β além do genótipo de gene *PYCARD* onde os animais AIRmin^{T/T} praticamente não respondem aos estímulos de ativação do inflamassoma. Os venenos de BjV e TsV comportam-se como um segundo sinal de ativação da via do inflamassoma principalmente nos animais AIRmáx. Assim, salientamos a importância da atuação do veneno como DAMPs e desencadeadores da resposta imune inata nos organismos.

CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso trabalho nos levou a compreender melhor os mecanismos por trás da resposta inflamatória dos venenos. Demonstrando uma maior toxicidade em células de animais com perfil de resposta inflamatória máxima.

A análise da ativação da via do inflamassoma, nos mostrou a importância da ação de um segundo mensageiro para a propagação da resposta do NLRP3. Bem como, nos leva a compreender a atividade do veneno como um segundo sinal, agindo como um DAMP.

O polimorfismo no gene *PYCARD* mostrou-se importante para o TsV. Esse veneno se utiliza da via do NLRP3, gerando a produção e liberação de IL-1 β por macrófagos, podendo ser uma das causas a presença de componentes que levam a um desbalanço iônico celular.

Nossos resultados ajudam a entender um dos mecanismos causadores de inflamação por trás da ação dos venenos. Ampliando o conhecimento dentro deste campo de estudo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Básica Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 5 eded. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2017.
- AMARANTE-MENDES, Gustavo P *et al.* Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, p. 2379, 2018..
- AMORIM, Fernanda Gobbi *et al.* Proteome of fraction from Tityus serrulatus venom reveals new enzymes and toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 25, 2019.
- AWAD, Fawaz *et al.* Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 187, p. 133–149, 2018.
- BERNARDE, Paulo Sérgio. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. 1. ed. Curitiba: Anolisbooks, 2014. v. 1
- BODA, Francisc *et al.* Effect of Bitis gabonica and Dendroaspis angusticeps snake venoms on apoptosis-related genes in human thymic epithelial cells. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 26, 2020.
- BOLDRINI-FRANÇA, Johara *et al.* Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1861, n. 4, p. 824–838, 2017.
- BORREGO, Andrea *et al.* Pycard and BC017158 Candidate Genes of Irm1 Locus Modulate Inflammasome Activation for IL-1 β Production. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, n. June, p. 1–16, 2022.
- CARNEIRO, Adriana S. *et al.* Bothrops jararaca venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: The role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 619–627, 2008
- CARNEIRO, Adriana S *et al.* Local inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 1571–1579, 2002.
- CARRASCO, Paola Andrea *et al.* Nomenclatural instability in the venomous snakes of the Bothrops complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon**, [s. l.], v. 119, p. 122–128, 2016.
- CHAN, Amy H.; SCHRODER, Kate. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 217, n. 1, 2020
- COLOGNA, Camila T. *et al.* Tityus serrulatus Scorpion Venom and Toxins: An Overview. **Protein & Peptide Letters**, Ribeirão Preto, v. 16, p. 920–932, 2009.
- FERRARI, Mario; FORNASIERO, Maria Chiara; ISETTA, Anna Maria. MTT

colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], p. 165–172, 1990.

IBANEZ, Olga M. *et al.* Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 2555–2563, 1992.

KALAPOTHAKIS, Yan *et al.* Novel components of Tityus serrulatus venom: A transcriptomic approach. **Toxicon**, [s. l.], v. 189, p. 91–104, 2021.

KISAKI, Carolina Yukiko *et al.* Bothrops jararaca snake venom modulates key cancer-related proteins in breast tumor cell lines. **Toxins**, [s. l.], v. 13, n. 8, 2021.

LEONEL, Thyago Bispo *et al.* Bothrops jararaca Snake Venom Inflammation Induced in Human Whole Blood: Role of the Complement System. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, 2022.

LI, Yangxin *et al.* Inflammasomes as therapeutic targets in human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2021

MALIK, Ankit; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Inflammasome activation and assembly at a glance. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 130, n. 23, p. 3955–3963, 2017.

MEDZHITOV, Ruslan. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001.

MELGAREJO, Aníbal R. Serpentes peçonhentas do Brasil. *In: ANIMAIS PEÇONHENTOS DO BRASIL: BIOLOGIA, CLÍNICA E TERAPÊUTICA DOS ACIDENTES*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009. v. 1, p. 42–70.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidente por animais peçonhentos - notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil**. [S. l.], 2022a. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidente por animais peçonhentos - Notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - Brasil**. [S. l.], 2022b. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], p. 55–63, 1983.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 8 eded. Porto Alegre: ARTMED® EDITORA S.A., 2014.

NETEA, Mihai G *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. **Science**, [s. l.], v. 352, n. 6284, 2016.

PALM, Noah W; MEDZHITOV, Ruslan. Role of the inflammasome in defense against venoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 5, p. 1809–1814, 2013.

PETRICEVICH, Vera L. **Scorpion venom and the inflammatory response**. [S. l.]: Hindawi Publishing Corporation, 2010.

PUCCA, Manuela Berto *et al.* **Tityus serrulatus venom - A lethal cocktail**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015.

REIN, Jan Ove. **BUTHIDAE**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/buthidae.php>.

RYAN, Rachael Y.M. *et al.* **Immunological Responses to Envenomation**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2021.

SOUZA, Jean Gabriel de; STAROBINAS, Nancy; IBAÑEZ, Olga C. M. Unknown/enigmatic functions of extracellular ASC. **Immunology**, [s. l.], v. 163, n. 4, p. 377–388, 2021.

VALDERRAMA, Nuñez *et al.* Efficacy of Bothrops jararaca venom on the changes in immune functions and TH1/TH2 cytokine balance in murine macrophages. **Medical Research Archives**, São Paulo, v. 4, n. 7, 2016.

VORRARO, Francisca *et al.* Genetic Control of IL-1 β Production and Inflammatory Response by the Mouse Irm1 Locus. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 185, n. 3, p. 1616–1621, 2010.

ZAMBONI, Dario S.; RABINOVITCH, Michel. Nitric Oxide Partially Controls Coxiella burnetii Phase II Infection in Mouse Primary Macrophages. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 1225–1233, 2003.

ZOCCAL, Karina Furlani *et al.* LTB4 and PGE2 modulate the release of MIP-1 α and IL-1 β by cells stimulated with Bothrops snake venoms. **Toxicon**, [s. l.], v. 150, p. 289–296, 2018.

ZOCCAL, Karina Furlani *et al.* Tityus serrulatus venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, [s. l.], v. 57, n. 7–8, p. 1101–1108, 2011.

ZOCCAL, Karina Furlani *et al.* TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from Tityus serrulatus to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e88174, 2014.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Ativação do inflamassoma por venenos em macrófagos de camundongos geneticamente selecionados para diferenças na inflamação", protocolada sob o CEUA nº 6965020222 (ID 002544), sob a responsabilidade de **Nancy Starobinas e equipe; Nathalia Caroline Teixeira Zana** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 16/02/2022.

We certify that the proposal "Inflammasome activation by venom in macrophage of mice genetically s.e.l.e.c.ted for different inflammatory capacity", utilizing 192 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6965020222 (ID 002544), under the responsibility of **Nancy Starobinas and team; Nathalia Caroline Teixeira Zana** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 02/16/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2022 a 03/2024** Área: **Imunogenética**

Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 4 meses	N:	64
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	AIRmax						
Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 4 meses	N:	64
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	AIRmin (TT)						
Origem:	Biotério Imunogenética	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	2 a 4 meses	N:	64
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	AIRmin (CC)						

Local do experimento: Laboratório de Imunogenética

São Paulo, 23 de fevereiro de 2022



Maria Leonor Sarmo de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan