



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDUARDO COLÓ BATTOCCHIO

**MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA HIPERALGESIA E
INFLAMAÇÃO DESENCADEADAS PELA PEÇONHA DO
ESCORPIÃO *Rhopalurus rochai* NA PATA DE
CAMUNDONGOS**

Londrina
2021

EDUARDO COLÓ BATTOCCHIO

**MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA HIPERALGESIA E
INFLAMAÇÃO DESENCADEADAS PELA PEÇONHA DO
ESCORPIÃO *Rhopalurus rochai* NA PATA DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B336 Baticchio, Eduardo Coló.
Modulação farmacológica da hiperalgesia e inflamação desencadeadas pela peçonha do escorpião *Rhopalurus rochai* na pata de camundongos / Eduardo Coló Baticchio. - Londrina, 2021.
57 f. : il.

Orientador: Fábio Henrique Kwasniewski.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Dor - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Escorpião - Tese. I. Kwasniewski, Fábio Henrique. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 615

EDUARDO COLÓ BATTOCCHIO

**MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA HIPERALGESIA E
INFLAMAÇÃO DESENCADEADAS PELA PEÇONHA DO
ESCORPIÃO *Rhopalurus rochai* NA PATA DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique
Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Stella Zamuner
Universidade Nove de Julho – UNINOVE

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de junho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos componentes da banca, Profa. Dra. Stella Zamuner e Prof. Dr. Phileno Pinge Filho pela participação.

Agradeço ao orientador Prof. Dr. Fábio H. Kwasniewski pela paciência e pelo aprendizado adquirido.

Ao Prof. Dr. Waldiceu Verri Junior por colaborar nesse projeto e pelas orientações.

Às colegas do Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer (LADINC), especialmente a Camila Ferraz e a Julia Bagatim, que contribuíram bastante para a realização dos experimentos.

Agradeço ao Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan por ter cedido a peçonha de *Rhopalurus rochai*.

Agradeço à CAPES pelo apoio e incentivo à pesquisa.

BATTOCCHIO, Eduardo Coló. **Modulação farmacológica da hiperalgesia e inflamação desencadeadas pela peçonha do escorpião *Rhopalurus rochai* na pata de camundongos.** 2021. 57 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O escorpionismo é um problema de saúde pública no mundo, sendo a família Buthidae a mais relevante nos aspectos clínicos. No Brasil, é o acidente envolvendo animais peçonhentos com maior número de casos registrados. Dentre os representantes da nossa escorpiofauna, o *Tityus serrulatus* é o escorpião envolvido na maioria dos acidentes moderados a graves, sendo também o mais estudado. Porém, outros representantes da família Buthidae no Brasil, como o *Rhopalurus rochai*, são ainda pouco estudados. O principal sintoma observado nos acidentes escorpiônicos é a dor, tema pouco explorado, até o momento, no campo de pesquisa. O envolvimento de mediadores inflamatórios na dor e hiperalgesia vem sendo relatado em estudos, tanto direta como indiretamente, sendo que em relação aos estudos induzidos por peçonhas escorpiônicas e fazendo tal associação, a quantidade de trabalhos é escassa. Outros parâmetros da inflamação recorrentes em acidentes escorpiônicos, como o edema e o recrutamento de neutrófilos também foram avaliados, sendo resultados inéditos aqui apresentados para o *Rhopalurus rochai*. O objetivo desse trabalho foi avaliar os potenciais fisiopatológicos da peçonha de *Rhopalurus rochai* (pRr), assim como a participação do NF- κ B, TNF- α , COX, histamina e NO na hiperalgesia mecânica, edema e recrutamento de neutrófilos na pata. Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (20 a 25g). A pRr liofilizada foi diluída em NaCl 0,9% no momento do uso e injetada i.pl. (20 μ L). Foram utilizados os fármacos PDTTC (inibidor de NF- κ B; 100mg/kg, 100 μ L, sc., 1h antes do estímulo); etanercepte (bloqueador de TNF- α ; 10mg/kg, 200 μ L, ip., 48h e 1h antes do estímulo); dexametasona (anti-inflamatório esteroide; 2 mg/kg, 10 μ L por gavagem, 1h antes do estímulo); indometacina (inibidor não-seletivo de COX; 5mg/kg, 200 μ L, ip., 40 minutos antes do estímulo); celecoxibe (inibidor seletivo de COX-2, 30mg/kg, ip., 1h antes do estímulo); pirlamina (agonista inverso do receptor H1, 6mg/kg, ip., 30 minutos antes do estímulo); L-NAME (inibidor não-seletivo de NO-sintase, 10mg/kg, ip., 30 minutos antes do estímulo). A hiperalgesia mecânica utilizando o método de von Frey (versão eletrônica) e o edema, utilizando um medidor de espessura, foram avaliados nos tempos de 0,5h, 1h, 3h e 6h após estímulo. Os tecidos plantares foram coletados 3 horas após o estímulo para a dosagem de MPO, utilizada como indicador indireto de recrutamento de neutrófilos. Das doses utilizadas da pRr (0,2, 0,6 e 2,4 μ g/pata) para avaliar a hiperalgesia mecânica, a de 2,4 μ g/pata induziu maior intensidade de hiperalgesia mecânica, e edema, tendo sido a escolhida para os experimentos subsequentes. A produção de IL-1 α e TNF- α foi avaliada pelo método de ELISA, com a concentração de ambas atingindo o pico após 3h do estímulo. O tratamento com PDTTC, dexametasona, etanercepte, indometacina e celecoxibe diminuiu a hiperalgesia mecânica e o edema. O tratamento com PDTTC, dexametasona e celecoxibe diminuíram o recrutamento de neutrófilos. O presente estudo conclui que a pRr foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica, edema, produção de IL-1 α e TNF- α , e recrutamento de neutrófilos em pata de camundongos e, que o NF- κ B, TNF- α , COX

têm participação na hiperalgesia mecânica e edema, enquanto, NF- κ B, COX-2 têm participação no recrutamento de neutrófilos.

Palavras-chave: dor; edema; citocinas; leucócitos; escorpião.

BATTOCCHIO, Eduardo Coló. **Pharmacological modulation of hyperalgesia and inflammation triggered by the scorpion *Rhopalurus rochai* venom in mice paw.** 2021 57 p. Dissertation (Master's degree in 2021) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Scorpionism is a public health issue over the world, being the Buthidae family the most relevant in clinical aspects. In Brazil, is the accident involving venomous animals with highest number of registered cases. Among the representatives of the scorpions found in Brazil, *Tityus serrulatus* is the involved in most of moderate and severe cases, being the more studied. However, other representatives of the Buthidae family in Brazil, such as *Rhopalurus rochai*, are still poorly studied. Pain is the main symptom observed in scorpion accidents, a topic that has been little explored so far in the research field. The involvement of inflammatory mediators in pain and hyperalgesia was reported in several studies, both directly and indirectly, and this association is scarce in the literature when it comes to scorpion venoms. Other recurrent inflammatory parameters observed in scorpionic accidents, such as edema and neutrophil recruitment, were also evaluated, being unpublished results for *Rhopalurus rochai*. The aim of this work was to evaluate the pathophysiological potentials of *Rhopalurus rochai* venom (pRr), as well as the participation of NF- κ B, TNF- α , COX, histamine and NO in mechanical hyperalgesia, edema and neutrophil recruitment in the paw. Male and female Swiss mice (20 to 25g) were used. The lyophilized pRr was diluted in 0.9% NaCl at the time of use and injected i.pl. (20 μ L). The drugs PDTC (NF- κ B inhibitor 100mg/kg, 100 μ L, sc., 1h before stimulus); etanercept (TNF- α blocker; 10mg/kg, 200 μ L, ip., 48h e 1h before stimulus); dexamethasone (steroidal anti-inflammatory; 2 mg/kg, 10 μ L by gavage, 1h before stimulus); indomethacin (non-selective COX inhibitor; 5mg/kg, 200 μ L, ip., 40 before stimulus); celecoxib (selective COX-2 inhibitor, 30mg/kg, ip., 1h before stimulus); pyrilamine (H1 receptor inverse agonist, 6mg/kg, ip., 30 before stimulus); L-NAME (non-selective NO-sintase inhibitor, 10mg/kg, ip., 30 before stimulus). Mechanical hyperalgesia using the von Frey method (electronic version) and edema using a thickness gauge were evaluated at 0.5h, 1h, 3h and 6h after stimulation. The plantar tissues were collected 3 hours after the stimulus for the measurement of MPO, used as indirect indicator of neutrophil recruitment. Of the doses used of pRr (0.2, 0.6 and 2.4 μ g/paw) to assess mechanical hyperalgesia, the 2.4 μ g/paw concentration induced greater intensity of mechanical hyperalgesia, and edema, which was chosen for subsequent experiments. The production of IL-1 α and TNF- α was evaluated by the ELISA method, with the concentration of both α reaching the peak after 3h of the stimulus. Treatment with PDTC, dexamethasone, etanercept, indomethacin and celecoxib decreased mechanical hyperalgesia and edema. Treatment with PDTC, dexamethasone, celecoxib decreased the recruitment of neutrophils. The present study concludes that pRr was able to induce mechanical hyperalgesia, edema, production of IL-1 α and TNF- α , and recruitment of neutrophils, and that NF- κ B, TNF- α , COX have a role in mechanical hyperalgesia and edema, while NF- κ B and COX-2 have a role in recruiting neutrophils.

Key-words: pain; edema; cytokines; leukocytes; scorpion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Rhopalurus rochai</i> e <i>Tityus serrulatus</i>	15
Figura 2 – Efeitos fisiopatológicos da pRr	27
Figura 3 – Efeitos dos pré-tratamentos com inibidores do NF- κ B sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr	29
Figura 4 – Efeitos dos pré-tratamentos com inibidores de COX sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr	31
Figura 5 – Efeitos do pré-tratamento com bloqueador de TNF- α sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr	32
Figura 6 – Efeitos do pré-tratamento com agonista inverso do receptor H1 sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr	33
Figura 7 – Efeitos do pré-tratamento com inibidor não-seletivo de NO-sintase sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	Adenosina Monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
COX	Ciclooxigenase
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Sinais de Perigo
EP	Receptor de Prostaglandina E
EPM	Erro Padrão da Média
ICAM-I	Molécula de Adesão Intercelular I
I κ B	Inibidor de kappa B
IKK	Proteína Quinase de Inibidor de kappa B
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
INF- γ	Interferon gama
L-NAME	Hidrocloreto de N ômega-nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MPO	Mieloperoxidase
Na ⁺	Sódio
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate ammonium salt
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
pRr	Peçonha de <i>Rhopalurus rochai</i>
TLR	Receptor do tipo toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNFR	Receptor de TNF
TRP	Receptor de Potencial Transitório
TRPV1	Receptor de Potencial Transiente Vaniloide 1
VCAM-I	Molécula de Adesão Celular Vascular I

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4	RESULTADOS	27
5	DISCUSSÃO	35
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Os animais peçonhentos são aqueles que possuem glândulas onde produzem e armazenam a peçonha, e aparelhos inoculadores, que são capazes de transferi-la para outro indivíduo, afim de defender-se de ameaças ou de atacar para obter alimento. As substâncias presentes na peçonha podem variar entre as diferentes espécies de animais, assim como seus aparelhos inoculadores, indo de presas e ferrões, até espículas e agulhões (ARBUCKLE, 2017). Os escorpiões, um dos animais peçonhentos mais comuns no mundo, possuem registros fósseis que datam de 450 milhões de anos e, atualmente, estima-se haver cerca de 2.200 espécies no mundo. Os escorpiões são classificados sendo do reino Animalia, filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e ordem Scorpiones (GOYFFON e TOURNIER, 2014; LOURENÇO, 2018). A família Buthidae é a principal de relevância clínica, pois engloba as espécies relatadas em acidentes com humanos. Na América Latina, o gênero *Tityus* é o que predomina, tendo representantes como: *T. cerroazul* na América Central; *T. obscurus*, *T. discrepans* e *T. zulianus* na América do Sul. No Brasil, encontram-se vários representantes do gênero *Tityus*, mas os principais em relação ao número e importância dos acidentes são: *T. serrulatus*, encontrado em quase todo território nacional; *T. bahiensis*, mais comum no Sudeste e Sul; *T. stigmurus*, que habita a região nordeste do país (BRASIL, 2009; PUCCA, 2014, WARD, 2018).

Escorpiões do gênero *Rhopalurus*, assim como os *Tityus*, pertencem à família Buthidae e, podem ser encontrados no Brasil. Relatos de caso envolvendo *Rhopalurus amazonicus* (FUENTES-SILVA, 2014) e *Rhopalurus agamemnon* (CARVALHO, 2007; BRANDÃO e FRANÇOSO, 2010) já foram descritos. O efeito da peçonha de *Rhopalurus* mais estudada até o momento corresponde ao *Rhopalurus junceus*, presente na América Central (DÍAZ-GARCÍA, 2015; YGLESIAS-RIVERA e DÍAZ-GARCÍA, 2018;). O *Rhopalurus rochai* (figura 1) é outra espécie encontrada no Brasil, mais precisamente nos biomas Cerrado e Caatinga (BRASIL., 2009), e estudos têm identificado a sua ampla distribuição em alguns Estados, como a Bahia e o Ceará (PORTO et al., 2010; CEARÁ, 2018) o que pode vir a se tornar um problema nos próximos anos, caso sua distribuição siga crescendo. Além disso, quase nada se sabe sobre os potenciais inflamatórios de sua peçonha. Pode ser observado na figura 1 que, embora muito parecido com o *Tityus serrulatus*, algumas

diferenças são rapidamente notadas: coloração amarelo claro ou palha bastante uniforme ao longo de todo o corpo do *Rhopalurus rochai* e amarelo mais escuro no *T. serrulatus* e com o corpo (mesossoma e prossoma – abdômen e cabeça) bastante escuro como as terminações dos pedipalpos (garras), a “cauda” (metassoma) amarela como os membros com o 5º segmento acompanhando a coloração do corpo, mais escuro.



FIGURA 1 – *Rhopalurus rochai* (à esquerda) e *Tityus serrulatus* (à direita). Extraído de Lourenço, W.R., 2016; e Porto et al. Scorpions, State of Bahia, northeastern Brazil. Checklist, v. 6, n. 2, 2010. Direitos pertencentes a Tiago Porto.

No Brasil, os dados disponíveis no portal do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) indicam que os acidentes com escorpiões são os mais numerosos quando comparados a outros animais peçonhentos, como serpentes, aranhas e lagartas. Do total de acidentes registrados envolvendo animais peçonhentos (2.164.852 casos) de 2007 a 2019 (período em que as notificações passaram a ocorrer com maior frequência) em torno de 50% foram com escorpiões (1.084.172), sendo que há quase 3 vezes mais casos destes últimos em relação a serpentes (367.199 casos) e aranhas (366.396 casos). Tais proporções tem se mantido nos últimos anos (gráfico 1), alertando que medidas de prevenção e tratamento têm sido cada vez mais necessárias a população (BRASIL, 2020). Embora tenha ocorrido melhora de recursos para realizar notificações assim como a disponibilização desses dados em portais de transparência, podem haver discrepâncias entre os dados reportados em regiões menos favorecidas economicamente e ou, isoladas de grandes centros urbanos, como as regiões em que o *R. rochai* é encontrado. As subnotificações podem ocorrer ainda devido aos sinais e sintomas serem leves, os quais são maioria no escorpionismo, no qual não

há necessidade da utilização de soros antiescorpiônico, contribuindo para uma possível irrealidade dos dados envolvendo as espécies de escorpiões brasileiros (FISZON, 2008).

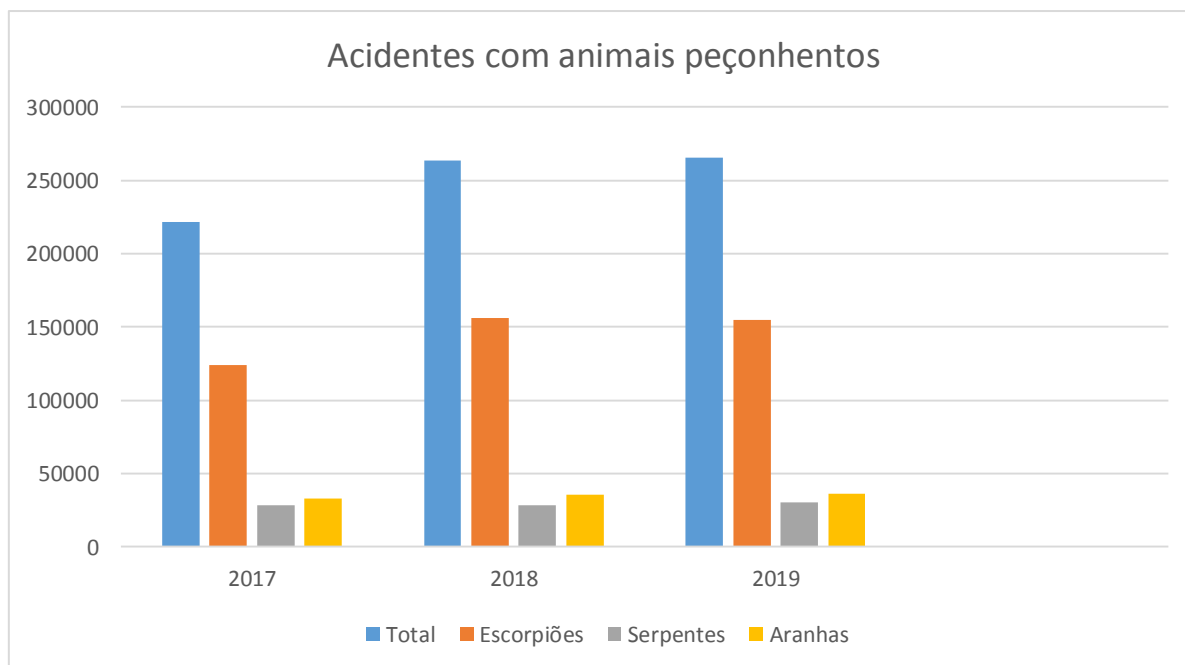


Gráfico 1 – Número de acidentes com animais peçonhentos no Brasil de 2017 a 2019.

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

A peçonha escorpiônica contém diferentes tipos de substâncias como sais inorgânicos, lipídeos, aminas bioativas, nucleotídeos, muco e, em maior quantidade, proteínas. Destas, há enzimas como hialuronidases, fosfatases, serino proteases, metaloproteinases e fosfolipases (TOBASSUM, 2018). Ainda entre as proteínas, há também as neurotoxinas, as quais atuam em canais iônicos específicos (Na^+ , K^+) de neurônios, causando intensificação de potenciais de ação com consequente liberação de neurotransmissores, como catecolaminas e acetilcolina, as quais contribuem para os efeitos sistêmicos que podem ser encontrados nas vítimas (VASCONCELOS, 2005; COLLAÇO, 2019).

Os quadros clínicos observados nos acidentes escorpiônicos são atualmente classificados em: classe I, classe II e classe III, de acordo com os sinais

e sintomas observados e relatados (KHATTABI, 2011). Dentro da classe I há manifestações locais como, eritema, edema e dor, principalmente. Já na classe II, começam a haver manifestações sistêmicas, como, náusea, vômitos e taquicardia, e na classe III, as complicações sistêmicas são intensas, levando a problemas cardíacos e pulmonares, que podem resultar em óbito, dependendo da condição de saúde da vítima. Em sua maior parte, os sinais e sintomas observados são em decorrência de processos inflamatórios desencadeados pelas peçonhas.

A inflamação é um processo biológico importante para a defesa do nosso organismo contra microrganismos, toxinas e corpos estranhos em geral. Seus mecanismos compreendem indução de febre, produção de citocinas, recrutamento de leucócitos para o tecido acometido, aumento da permeabilidade vascular para facilitar o transporte de proteínas do plasma para o tecido, e, dor, como uma forma de alertar sobre possíveis danos ao tecido. Normalmente, a inflamação é autolimitante, porém, o desequilíbrio da intensidade da inflamação gerada pode levar a desconfortos, ou até mesmo, agravar a situação de saúde do indivíduo (CHEN et al, 2018). Diversos mediadores podem estar envolvidos no processo inflamatório, a depender do estímulo e contexto. Uma das principais moléculas envolvidas na inflamação é o NF- κ B, fator de transcrição que induz a expressão de vários mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8; moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1) e enzimas importantes como a COX. O NF- κ B em sua forma basal está ligado a I κ B no citosol, e quando é induzido por sinalizações inflamatórias, a I κ B é fosforilada por IKKs, se liga à ubiquitinas e é então degradada por proteassomos, liberando o NF- κ B, que se desloca ao núcleo, onde se liga a regiões promotoras, induzindo a expressão de uma grande diversidade de moléculas, entre elas, os mediadores inflamatórios (LIU, 2017).

O TNF- α é uma das citocinas clássicas descritas, que ao se ligar aos receptores TNFR1 e TNFR2 podem exercer diversas funções, como: induzir a proliferação celular; induzir a ativação do NF- κ B, culminando na produção de diversos mediadores inflamatórios; induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos; induzir a apoptose de células infectadas, estressadas ou com desequilíbrio bioquímico (SEDGER e McDERMOTT, 2014). O aumento da produção de TNF- α foi relatado no escorpionismo (FUKUHARA, 2003; ABDEL-HALEEM, 2006; JALALI, 2011) assim como em modelos experimentais em murinos (ADI-

BESSALEM, 2008; ZOCCAL, 2013). A importância do TNF- α na hiperalgesia foi descrita por Cunha et al (1992), o qual observou ações diretas da molécula na pata de ratos estimulando o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica.

A IL-1 β é outra importante citocina envolvida em reações inflamatórias. Entre as suas diversas funções, destacam-se: a ativação de fagócitos; indução de febre; indução da produção de proteínas de fase aguda; ativação de células endoteliais para expressarem moléculas de adesão. A IL-1 β é produzida em resposta aos PAMPs e DAMPs, através da sinalização de PRRs extracelulares, como os TLRs, induzindo a expressão do precursor Pró-IL-1 β . A clivagem desse precursor para convertê-lo em IL-1 β ativa depende da formação do inflamassoma NLRP, os quais são formados em resposta a estímulos citosólicos como, produtos microbianos e alterações iônicas (ABBAS, 2015). Além das funções destacadas anteriormente, a IL-1 β foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica, conforme descrito por Ferreira et al (1988), assim como a sua produção induzida por peçonhas escorpionicas (ZOCCAL, 2016; MIYAMOTO, 2018).

Os mediadores lipídicos também têm sua importância no processo inflamatório, sendo os eicosanoides os mais estudados. A produção de tais mediadores ocorre através da conversão de fosfolipídeos de membranas celulares em ácido araquidônico, pelas fosfolipases A₂. As enzimas ciclo-oxigenases são responsáveis por converter o ácido araquidônico em prostanoídes, sendo estes: prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina. As COX possuem duas isoformas em humanos: a COX-1 é expressa constitutivamente e tem funções de citoproteção gástrica e hemostase. Embora seja considerada menos relevante em processos inflamatórios, também participa da conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, envolvidas na inflamação. A COX-2 é induzível e pode ser expressa em resposta a diferentes estímulos inflamatórios (RICCIOTTI e FITZGERALDI, 2011). As prostaglandinas, principalmente a PGE₂, ao se ligarem a receptores EP expressos em nociceptores, são capazes de induzir sinalizações intracelulares que induzem o influxo de Ca²⁺ e consequente ativação da PKC, ou ainda, a ativação da adenilato ciclase, que catalisa a hidrólise de ATP em AMPc, que por sua vez ativa a PKA. Ambas as enzimas fosforilam e ativam o TRPV1, receptor envolvido na dor (KAWABATA, 2011).

A histamina é uma monoamina que possui funções de: induzir

vasodilatação e broncoconstrição, através da regulação da musculatura lisa; regular outras células imunes, como a proliferação de células T auxiliares; induzir a expressão de moléculas de adesão e, ainda, pode atuar em nociceptores através de diferentes receptores (H_1 - H_4) para induzir dor e hiperalgesia (THANGAM, 2018). Tem sido relatado também o seu envolvimento em parâmetros inflamatórios induzidos por peçonhas escorpiônicas (NASCIMENTO, 2005; LIU, 2007). A sua produção é feita principalmente pelos mastócitos, células do sistema imune residentes em mucosas e tecidos epiteliais, que armazenam a histamina em grânulos e as liberam prontamente frente à diferentes estímulos (KRYSTEL-WHITTEMORE, 2016).

O óxido nítrico é uma molécula gasosa produzida a partir do aminoácido L-arginina pelas enzimas NO-sintases. Elas consistem em três isoformas: a NO-sintase endotelial e a NO-sintase neuronal, ambas expressas constitutivamente e, ainda, a NO-sintase induzível, expressa em contextos inflamatórios. Suas funções incluem a modulação da vasodilatação; de produção de espécies reativas de nitrogênio, que podem eliminar microrganismos; da ativação de leucócitos; da inibição da agregação plaquetária (FORSTERMANN e SESSA, 2012), além de ser um mediador envolvido na dor (CURY, 2011).

Os potenciais inflamatórios de peçonhas escorpiônicas têm sido descritos, como a capacidade de ativar macrófagos e neutrófilos (PETRICEVICH, 2002; PETRICEVICH; LEBRUN, 2005; BORGES, 2011) e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL- 1β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , de modo experimental (PETRICEVICH e PEÑA, 2002; PESSINI et al., 2003; FIALHO, 2011) ou em humanos (MAGALHÃES, 1999; D'SUZE, 2003; FUKUHARA, 2003). A migração de leucócitos é outro parâmetro observado em ensaios envolvendo peçonhas de escorpião relacionado a inflamação. Peçonhas de diferentes escorpiões induziram o recrutamento de leucócitos para o local estimulado, entre eles: *T. serrulatus* (PESSINI, 2003; FIALHO, 2011) e *Androctonus australis hector* (SAIDANI, 2018), que pode contribuir para intensificar os sinais e sintomas observados.

A presença de edema é constante em relatos de casos com vítimas do escorpionismo (CUPPO, 2015; SANTOS, 2016), além de ser um tema bem explorado em modelos experimentais, abordando desde estímulos locais (NASCIMENTO, 2005; PESSINI, 2008; SEVERINO, 2009), até complicações sistêmicas, envolvendo o edema pulmonar principalmente (FREIRE-MAIA, 1993;

ZOCCAL, 2016; MIYAMOTO, 2018). O edema é um dos sinais cardinais da inflamação descritos por Celsus na antiguidade, caracterizado pelo acúmulo de líquido e proteínas de alto peso molecular no interstício (exsudato), devido ao extravasamento dos vasos sanguíneos (KUMAR, 2010). Mediadores como o TNF- α , IL-1 β e histamina ativam células endoteliais e induzem a expressão de moléculas de adesão como: E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, essenciais para o recrutamento de leucócitos ao local de lesão; também induzem a quebra de interações célula-célula, permitindo a passagem do fluido plasmático (WALLEZ e HUBER, 2008).

Como destacado anteriormente, a dor é um importante evento inflamatório relacionado ao escorpionismo, sendo relatada desde os casos mais leves até os quadros mais graves. A dor é definida pela IASP (International Association for the Study of Pain) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante aquela associada a, dano real ou potencial ao tecido” (disponível em: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>. Acesso em: 26 jan. 2021.). A dor resulta de estímulos a nociceptores, neurônios especializados que possuem receptores para estímulos nocivos e que transmitem os impulsos nervosos para os outros neurônios da via nociceptiva. Estes neurônios localizam-se em tecidos periféricos e seus núcleos convergem para o gânglio da raiz dorsal, entram na medula espinhal pelo corno dorsal, fazem a comunicação com os neurônios aferentes secundários, os quais fazem decussação e vão para o cérebro via trato espinotalâmico. No tálamo comunicam-se com neurônios terciários, que então se projetam para áreas corticais. Os estímulos nocivos que induzem a ativação dos nociceptores podem ser químicos, térmicos ou mecânicos, que induzem a ativação de canais iônicos como Na_v (canais de sódio dependente de voltagem) e TRPs principalmente. A dor inflamatória é um dos tipos de dor descritos, onde mediadores inflamatórios como citocinas, mediadores lipídicos e fatores de crescimento, são produzidos pelas células imunes e outras células residentes para combater o estímulo nocivo, e então ligam-se a seus respectivos receptores em nociceptores, induzindo a ativação de canais iônicos. Estes por sua vez adquirem conformações que permitem o influxo de íons, com consequente despolarização de membrana, resultando em geração de potenciais de ação. As vias da p38 MAPK, PKA e PKC estão entre as principais nesse contexto, culminando na fosforilação de canais iônicos e induzindo o aumento de permeabilidade e o influxo de Na⁺ e Ca⁺⁺,

principalmente (BARAL e CHIU, 2019).

A inflamação pode induzir ainda a hiperalgesia, sensibilidade exacerbada a um estímulo nocivo. Devido a estímulos de mediadores inflamatórios, como os citados anteriormente, principalmente as citocinas, classicamente a IL-1 β e o TNF- α , que dependendo do contexto, induzem a expressão de canais iônicos e estimulam a fosforilação de canais iônicos voltagem-dependentes, como os Navs, facilitando a ativação dos nociceptores (PINHO-RIBEIRO, 2017).

A dor induzida por peçonhas de diferentes animais vem sendo estudada nos últimos anos, como das serpentes como *Bothrops moojeni*, *Bothrops mattogrossensis*, *Bothrops jararaca* (NADUR-ANDRADE, 2016; MALANGE, 2018; BONAVITA, 2006); assim como de aranhas, *Ctenus medius*, *Phoneutria nigriventer* e *Latrodectus curacaviensis* (OKAMOTO, 2009; LAURIA, 2018). A peçonha de escorpiões também tem sido alvo de estudos relacionados a dor (NASCIMENTO, 2005; PESSINI, 2008; DEUIS, 2016), sendo que a dos *Tityus serrulatus* é a única estudada no Brasil. Até o momento não há estudos envolvendo o gênero *Rhopalurus* e a dor inflamatória.

Muitos avanços foram feitos nos estudos de animais peçonhentos e os componentes de suas peçonhas. Porém, ainda há lacunas acerca de várias espécies, assim como o potencial de suas peçonhas. Assim sendo, o objetivo desse trabalho é compreender o potencial da peçonha do *R. rochai* em induzir aspectos inflamatórios como a dor, o edema e o recrutamento de leucócitos na pata de camundongos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação de mediadores inflamatórios na hiperalgesia mecânica, edema e recrutamento de neutrófilos induzidos pela peçonha do escorpião *Rhopalurus rochai* em patas de camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a participação de:

- NF- κ B;
- TNF- α ;
- COX-1 e 2;
- Óxido nítrico sintase;
- Histamina.

Nos seguintes parâmetros:

- Hiperalgesia mecânica (von Frey eletrônico);
- Edema na pata estimulada;
- Migração de neutrófilos para o tecido estimulado (dosagem de MPO).

MATERIAIS E MÉTODOS

1 Animais:

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (20 a 25 g) obtidos e mantidos no biotério da Universidade Estadual de Londrina em gaiolas com no máximo 10 animais, com ração e água *ad libitum* e em ciclo claro/escuro de 12 horas. O estudo foi conduzido com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina sob os protocolos nº 21366.2015.72 e nº 014.2020.

2 Peçonha:

A peçonha liofilizada do *R. rochai* (pRr) foi cedida pelo Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan; estocada em -20°C e no momento do uso foi diluída em solução salina apirogênica 0,9%.

3 Avaliação da hiperalgesia mecânica:

A avaliação da hiperalgesia mecânica foi realizada nos tempos de 0,5h, 1h, 3h e 6h, pelo método de von Frey modificado por Cunha et al., 2004, com auxílio de um analgesímetro digital (Insight). Este aparelho consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno. Os animais foram colocados em placas de acrílico, constituída por uma rede de arame não maleável, durante 30 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Em seguida, foi aplicada pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de flinch após a retirada da pata. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida, subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) após a administração intraplantar das diferentes doses da peçonha escorpionica. A partir desse experimento, definimos a dose da pRr que induziu maior

intensidade a ser utilizada nas próximas avaliações.

4 Avaliação do edema na pata:

As alterações no volume da pata foram determinadas com o auxílio de um medidor de espessura (10mm Mitutoyo 7301®). A medida do volume da pata dos animais foi avaliada antes da administração da peçonha (tempo 0), e nos tempos de 0,5h, 1h, 3h e 6h horas após sua administração. Os resultados foram calculados através da diferença entre a média de 2 medições após o estímulo e a média de 2 medições antes do estímulo (basal) (Maioli, 2015).

5 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO):

A quantificação da migração de neutrófilos ao tecido subcutâneo plantar foi realizada pela avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), baseando-se na técnica descrita por Bradley et al. (1982). Para tanto, a pRr foi injetada via intraplantar e, ao final de 3 horas as amostras do tecido subcutâneo plantar foram coletadas e inseridas em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo HTAB (Brometo de hexadecil trimetil amônio) 13,72 mM, pH 6,0, 200µL por tubo. As amostras foram homogeneizadas com auxílio do Polytron (PT3100), seguida de centrifugação (2 min, 16.100 g, a 4°C). A dosagem por reação colorimétrica cinética foi realizada em placas de 96 poços contendo 10µL dos sobrenadantes das amostras e 200µL da solução de reação (52,64 mM de dihidroclorato de O-dianisidina, 0,05% de H₂O₂ 30%, 90 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 e 10 mL de H₂O destilada). Foram realizadas duplicatas e leituras em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm (Spectra MAX 250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por miligrama de tecido, utilizando-se uma curva padrão de neutrófilos para realizar os cálculos.

6 Dosagens das citocinas TNF-α e IL-1β:

Os tecidos plantares foram coletados nos tempos indicados após estímulo com a pRr e triturados com ultraturrax (ULTRA-TURRAX®) em tampão contendo inibidores de protease para dosagem dos níveis de TNF-α e IL-1β usando kits ELISA comerciais de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience®, Ready-SET-Go).

7 Pré-tratamentos farmacológicos para avaliar a participação de NF- κ B, COX-1 e 2, TNF- α , óxido nítrico e histamina nos parâmetros de hiperalgesia mecânica, edema e atividade de MPO:

A hiperalgesia induzida pela peçonha foi avaliada após o tratamento sistêmico dos animais com diferentes inibidores farmacológicos como: bloqueador de TNF- α (etanercepte), 10mg/kg, 200 μ L, ip., 48h e 1h antes do estímulo (FERRAZ, 2015), obtido de Wyeth Indústria Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil); um inibidor de NF- κ B (*pyrrolidine dithiocarbamate ammonium salt* – PDTC), Sigma, 100mg/kg, 100 μ L, sc. 1h antes do estímulo (FERRAZ, 2015), obtido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), além de um glicocorticoide, que entre as suas funções está a de inibir o NF- κ B (Dexametasona), 2mg/kg, 100 μ L, sc. 1h antes do estímulo (VERRI, 2005) obtido de Laboratório Teuto Brasileiro (São Paulo, Brasil); inibidor não-seletivo de COX (Indometacina), 5mg/kg, 200 μ L, ip., 40 minutos antes do estímulo (ZARPELON, 2012) obtido de Aspen Pharma Brasil (Rio de Janeiro, Brasil); inibidor seletivo de COX-2 (Celecoxibe), 30mg/kg, ip., 1h antes do estímulo (MAIOLI, 2015) obtido de Pharmacia–Pfizer (São Paulo, Brasil); agonista inverso do receptor H₁ (Pirilamina), 6mg/kg, ip., 30 minutos antes do estímulo (FERREIRA, 2009) obtido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); inibidor não-seletivo de NO-sintase (L-NAME), 10mg/kg, ip., 30 minutos antes do estímulo (SEVERINO, 2009), obtido de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

8 Histologia:

Os tecidos plantares foram coletados 3 horas após o estímulo com a pRr e embebidos em parafina para o processamento e coloração com hematoxilina e eosina (H&E). As amostras foram fixadas em solução contendo 10% de paraformaldeído em PBS, anteriormente à embebição. As imagens foram capturadas por um programa acoplado a um microscópio óptico, com aumentos de 10 vezes.

9 Análise estatística:

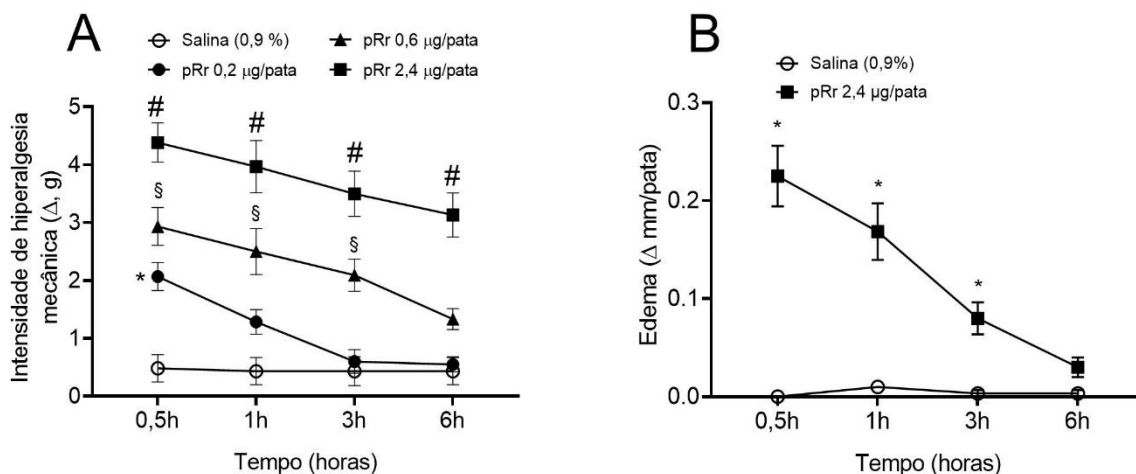
Os resultados foram apresentados como média \pm EPM das medições feitas em 6 camundongos em cada grupo por experimento, representativos de experimentos independentes. A análise de variância de dois

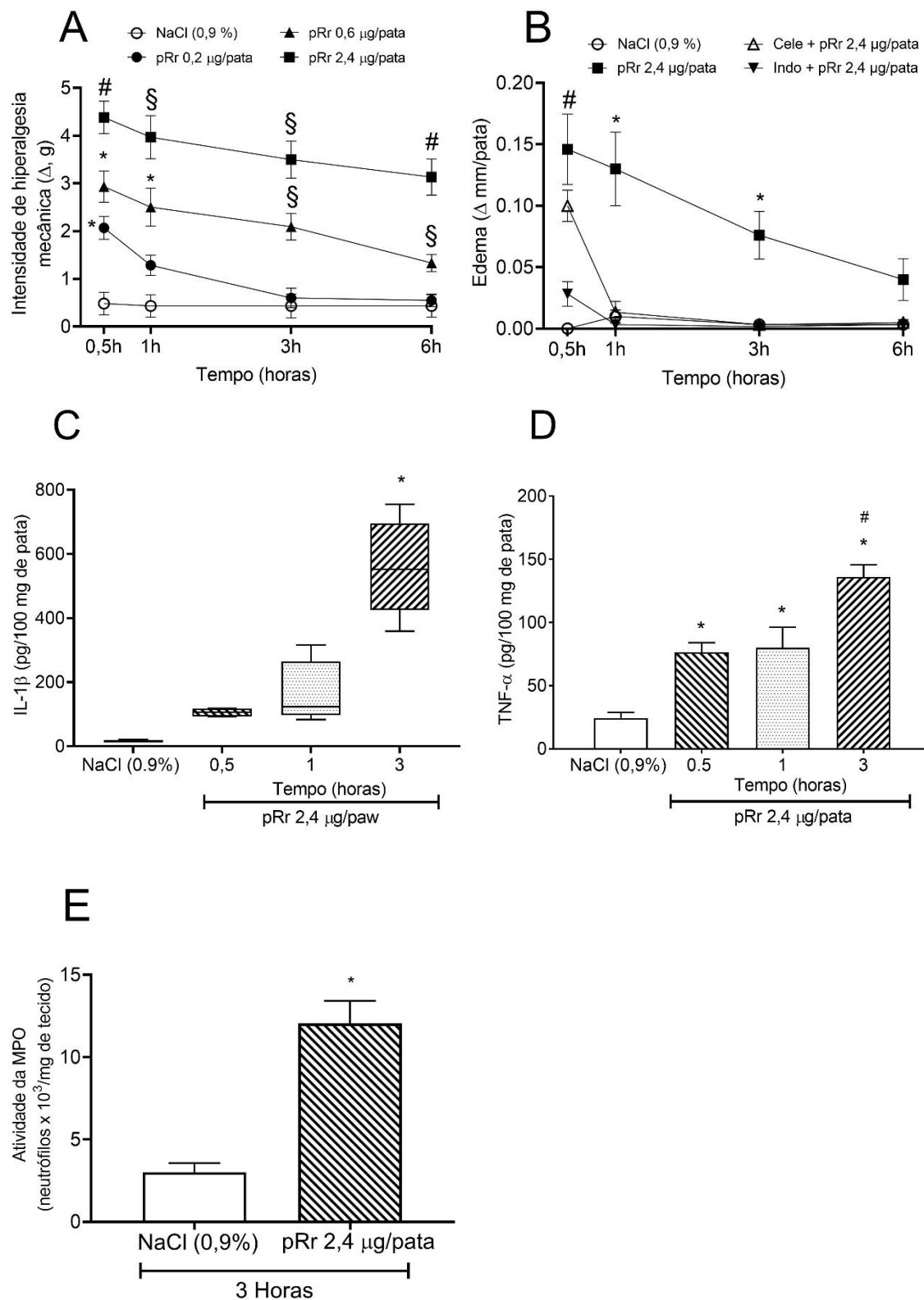
fatores (Two-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey foi utilizada quando as respostas foram medidas em diferentes momentos após a injeção do estímulo. A análise de variância de um fator (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foi realizado para comparar os valores nos pontos de tempo indicados. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi realizado para os grupos que não apresentaram homogeneidade das variâncias. Foi realizado o teste t não-pareado para a análise da comparação entre dois grupos em um determinado tempo. Em todos os cálculos foi fixado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e utilizado o software Prism 6.0.

Resultados

1. A pRr induziu hiperalgesia mecânica, edema, produção de IL-1 β e TNF- α e recrutamento de neutrófilos.

Entre as doses utilizadas de forma arbitrária para o primeiro experimento, a avaliação de hiperalgesia mecânica, a de 2,4 $\mu\text{g/pata}$ foi a que induziu maior intensidade e a única em que observamos a hiperalgesia em todos os tempos avaliados (figura 2A), sendo essa dose a selecionada para os experimentos posteriores. A pRr induziu edema na pata estimulada até a 3^a hora (figura 2B). As concentrações de IL-1 β estavam aumentadas somente na 3^a após estímulo, enquanto que as concentrações de TNF- α tiveram aumento desde 0,5 hora, mantiveram-se em 1 hora e tiveram aumento ainda maior na 3^a hora (figura 2C e D). A pRr induziu ainda o recrutamento de neutrófilos, avaliados nesse trabalho como a atividade de MPO no tecido plantar coletado 3 horas após o estímulo, sendo medida indireta de migração (figura 2E). As histologias dos tecidos plantares ilustram o aumento da quantidade de leucócitos nos tecidos estimulados (figuras 2F e G).





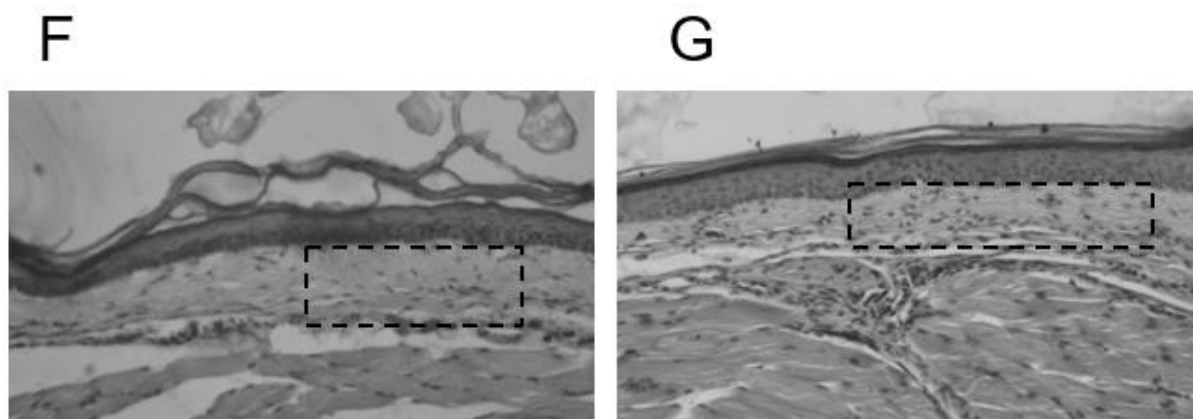
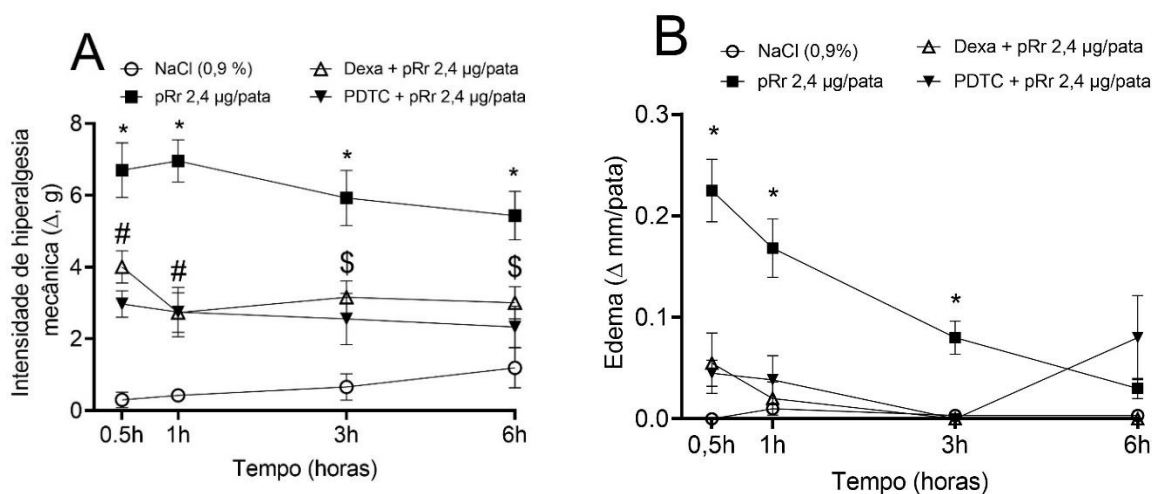


Figura 2 – Efeitos fisiopatológicos da pRr. Em **A**, hiperalgesia mecânica de grupos estimulados com as concentrações de 0,2 µg/pata; 0,6 µg/pata; 2,4 µg/pata. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (0,9%). § $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina (0,9%) e 0,2µg/pata. # $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina (0,9%), 0,2µg/pata e 0,6µg/pata. Em **B**, edema na pata estimulada com pRr 2,4 µg/pata. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina 0,9%. Em **C**, dosagem de IL-1 β do tecido plantar. * $p < 0,05$ comparado aos outros grupos. Em **D**, dosagem de TNF- α do tecido plantar. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (0,9%). # $p < 0,05$ comparado aos grupos avaliados 0,5 e 1h após estímulo com a pRr. Em **E**, atividade de MPO no tecido plantar 3 horas após estímulo com a pRr. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (0,9%). 6 animais por grupo. Em **F**, histologia do grupo Salina (0,9%) e em **G**, histologia do grupo pRr 2,4µg/pata, após 3 horas. Os dados foram expressos como médias \pm EPM.

2. Efeito dos pré-tratamentos com inibidores de NF- κ B.

Os pré-tratamentos com dexametasona e PDTC diminuíram a hiperalgesia mecânica em relação ao grupo estimulado com a pRr, em todos os tempos avaliados. Ambos os fármacos tiveram diferença em relação ao grupo salina em 0,5 e 1 hora e, somente dexametasona diferiu em 3 e 6 horas (figura 3A). Os dois fármacos também reduziram o edema induzido pela pRr em todos os tempos (figura 3B). Os fármacos ainda reduziram a atividade de MPO (figura 3C).



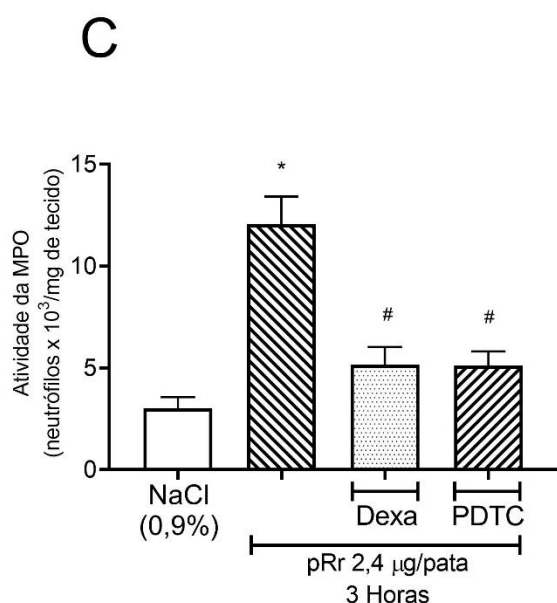


Figura 3 – Efeitos dos pré-tratamentos com inibidores do NF- κ B sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr. Grupos tratados com dexametasona (2mg/kg s.c. 1h antes) e PDTC (100mg/kg s.c. 1h antes). Em **A**, hiperalgesia mecânica. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina (0,9%), Dexametasona e PDTC. # $p < 0,05$ grupos Dexametasona e PDTC comparados ao grupo Salina 0.9%. \$ $p < 0,05$ grupo Dexametasona comparado ao grupo Salina (0,9%). Em **B**, edema na pata estimulada. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina (0,9%), Dexametasona e PDTC. # $p < 0,05$ grupo PDTC comparado ao grupo Salina (0,9%). Em **C**, atividade de MPO no tecido plantar 3 horas após estímulo com a pRr. * $p < 0,05$ comparado aos grupos salina (0,9%), Dexametasona e PDTC. # $p < 0,05$ comparado ao grupo pRr. 6 animais machos por grupo em **A** e **B**, e 6 animais fêmeas por grupo em **C**. Os dados foram expressos como médias \pm EPM.

3. Efeito dos pré-tratamentos com inibidores de COX.

Foram utilizados um fármaco inibidor de COX não-seletivo (indometacina) e um seletivo para COX-2 (celecoxibe). Ambos reduziram a hiperalgesia mecânica induzida pela pRr em todos os tempos avaliados. O grupo indometacina diferiu do grupo salina em todos os tempos e, o grupo celecoxibe em 0,5, 1 e 3 horas (figura 4A). Os inibidores de COX inibiram o edema nos tempos avaliados, exceto o grupo celecoxibe no tempo 0,5 hora (figura 4B). O celecoxibe inibiu ainda a migração de neutrófilos, sendo que indometacina não teve efeito (figura 4C).

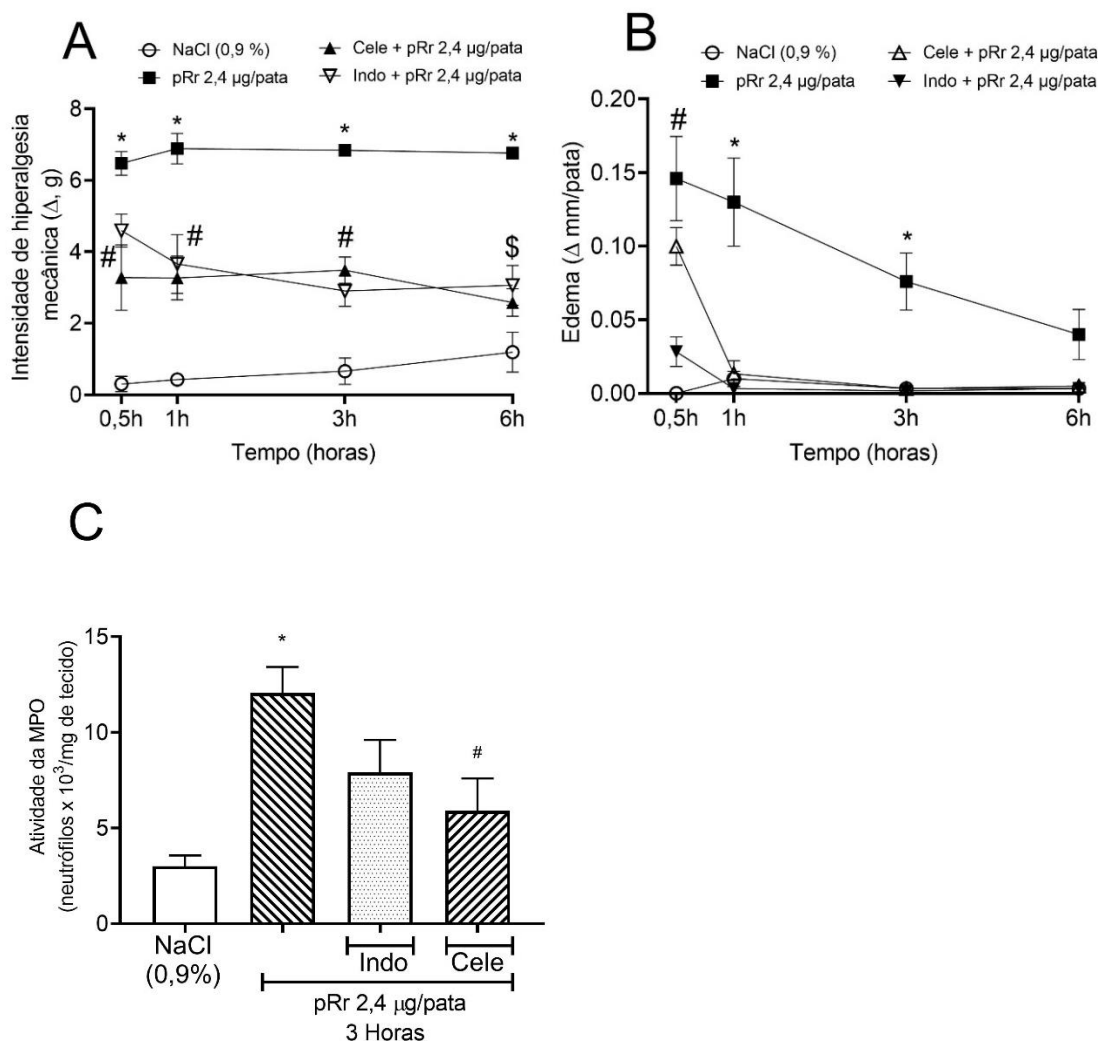


Figura 4 – Efeitos dos pré-tratamentos com inibidores de COX sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr. Grupos tratados com celecoxibe (30mg/kg i.p. 30 minutos antes) e indometacina (5mg/kg i.p. 1h antes). Em **A**, hiperalgesia mecânica. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina (0,9%), Celecoxibe e Indometacina. # $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (0,9%). \$ $p < 0,05$ grupos Celecoxibe e Indometacina comparados ao grupo Salina (0,9%). Em **B**, edema na pata estimulada. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina (0,9%), Celecoxibe e Indometacina. # $p < 0,05$ grupos pRr 2,4 μg/pata e Celecoxibe comparados aos grupos Salina (0,9%) e Indometacina. Em **C**, atividade de MPO no tecido plantar 3 horas após estímulo com a pRr. * $p < 0,05$ comparado aos grupos salina (0,9%) e celecoxibe. # $p < 0,05$ comparado ao grupo pRr. 6 animais machos por grupo em **A** e **B**, e 6 animais fêmeas por grupo em **C**. Os dados foram expressos como médias \pm EPM.

4. Efeitos do pré-tratamento com bloqueador de TNF- α .

A administração de etanercepte diminuiu a hiperalgesia mecânica em todos os tempos avaliados, em comparação ao grupo pRr. O fármaco ainda teve diferença em relação ao grupo salina nos tempos de 0,5 hora, 1 hora e 3 horas (figura 5A). O fármaco também inibiu o edema em todos os tempos avaliados (figura 5B). Em relação ao recrutamento de neutrófilos, o bloqueador de TNF- α não teve

qualquer efeito (figura 5C).

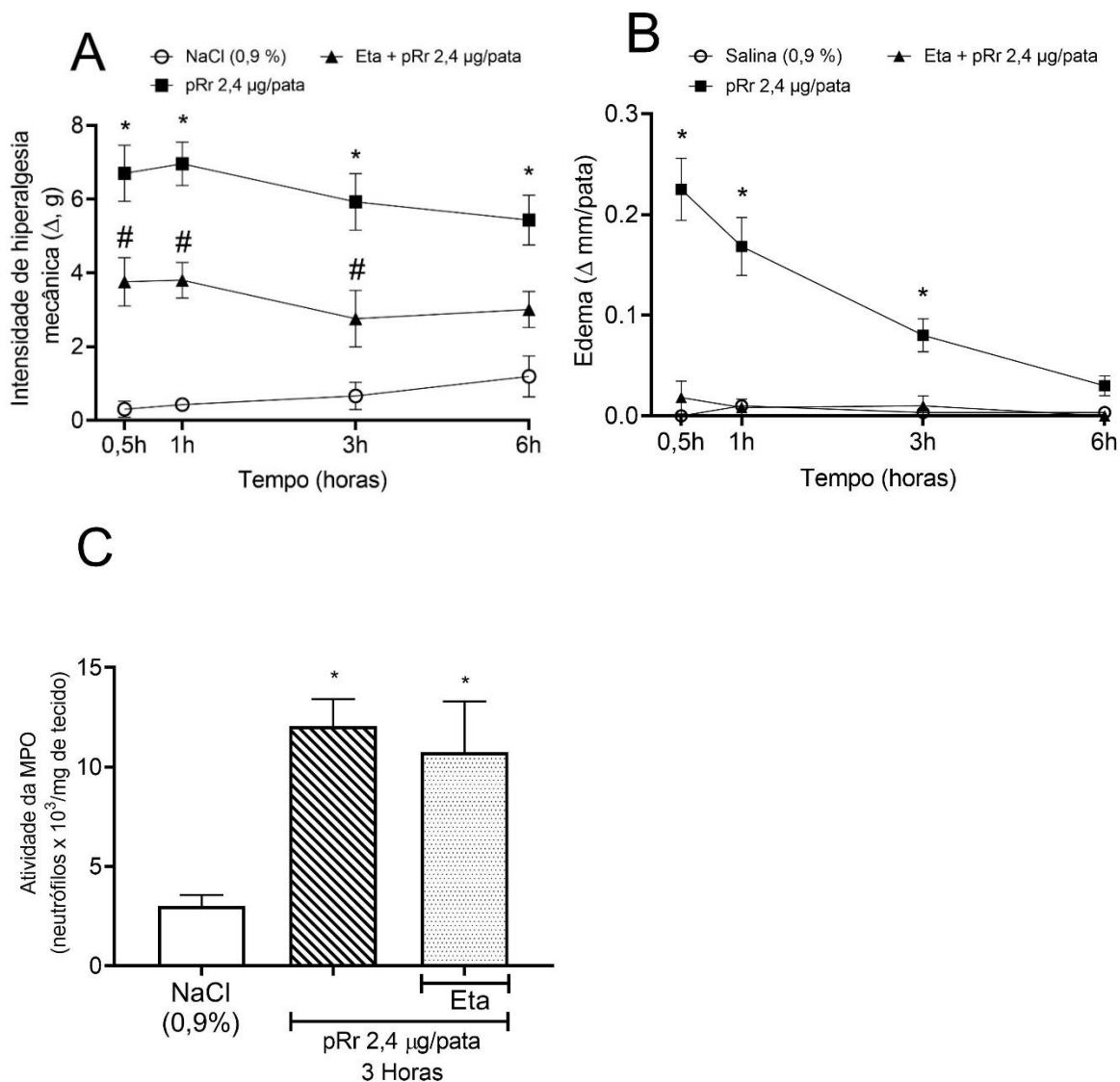


Figura 5 – Efeitos do pré-tratamento com bloqueador de TNF- α sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr. Grupos tratados com Etanercepte (10mg/kg i.p. 48h e 1h antes). Em **A**, hiperalgesia mecânica. * $p < 0,05$ comparado aos grupos salina (0,9%) e etanercepte. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (0,9%). Em **B**, edema na pata estimulada. * $p < 0,05$ comparado aos grupos Salina (0,9%) e Etanercepte. Em **C**, atividade de MPO no tecido plantar 3 horas após estímulo com a pRr. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (0,9%). 6 animais machos por grupo em **A** e **B**, e 6 animais fêmeas por grupo em **C**. Os dados foram expressos como médias \pm EPM.

5. Efeitos do pré-tratamento com agonista inverso do receptor H₁.

O pré-tratamento com pirlamina diminuiu a hiperalgesia na 3^a e na 6^a hora (figura 6A). A pirlamina diminuiu o edema em 0,5 hora (figura 6B). O fármaco não teve efeito no recrutamento de neutrófilos para o tecido plantar (figuras 6C).

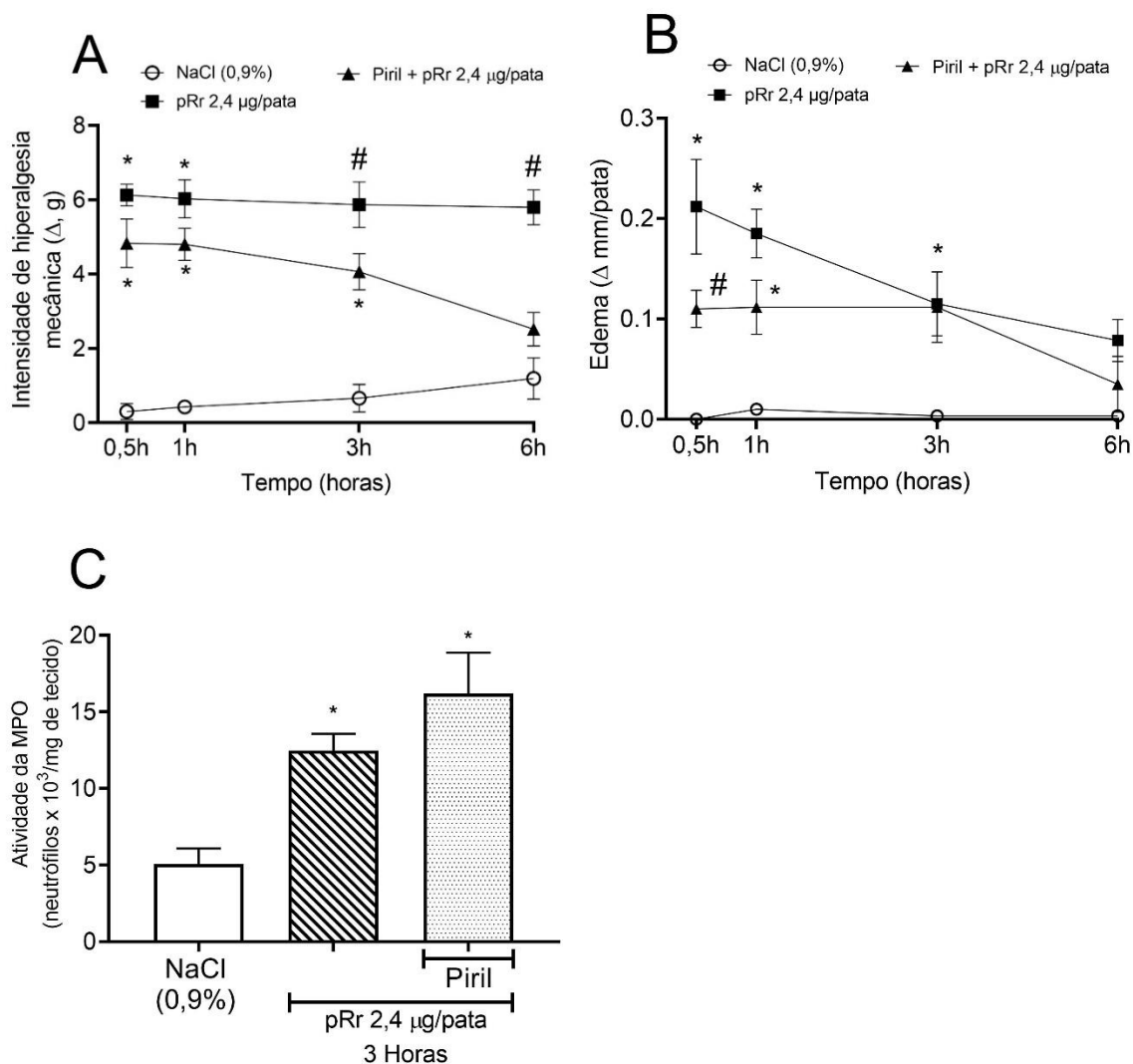


Figura 6 – Efeitos do pré-tratamento com agonista inverso do receptor H_1 sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr. Grupos tratados com pirilamina (6mg/kg i.p. 30 minutos antes). Em **A**, hiperalgesia mecânica. * $p < 0,05$ grupos pRr 2,4 $\mu\text{g/pata}$ e Pirilamina comparados ao grupo Salina (0,9%). # $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (0,9%) e Pirilamina. Em **B**, edema na pata estimulada. * $p < 0,05$ comparados ao grupo Salina (0,9%). # $p < 0,05$ comparado ao grupo pRr 2,4 $\mu\text{g/pata}$. Em **C**, atividade de MPO no tecido plantar 3 horas após estímulo com a pRr. * $p < 0,05$ comparado aos grupos salina (0,9%) e Pirilamina. # $p < 0,05$ comparado ao grupo pRr. 6 animais fêmeas por grupo. Os dados foram expressos como médias \pm EPM.

6. Efeitos do pré-tratamento com inibidor não-seletivo de NO-sintase.

O grupo pré-tratado com L-NAME diminuiu a hiperalgesia mecânica nos tempos de 0,5h, 1h e 3h (figura 7A). O edema não foi modificado pelo tratamento com L-NAME (7B). Em relação à atividade de MPO, o L-NAME não teve efeito no tempo avaliado (figuras 7C e D).

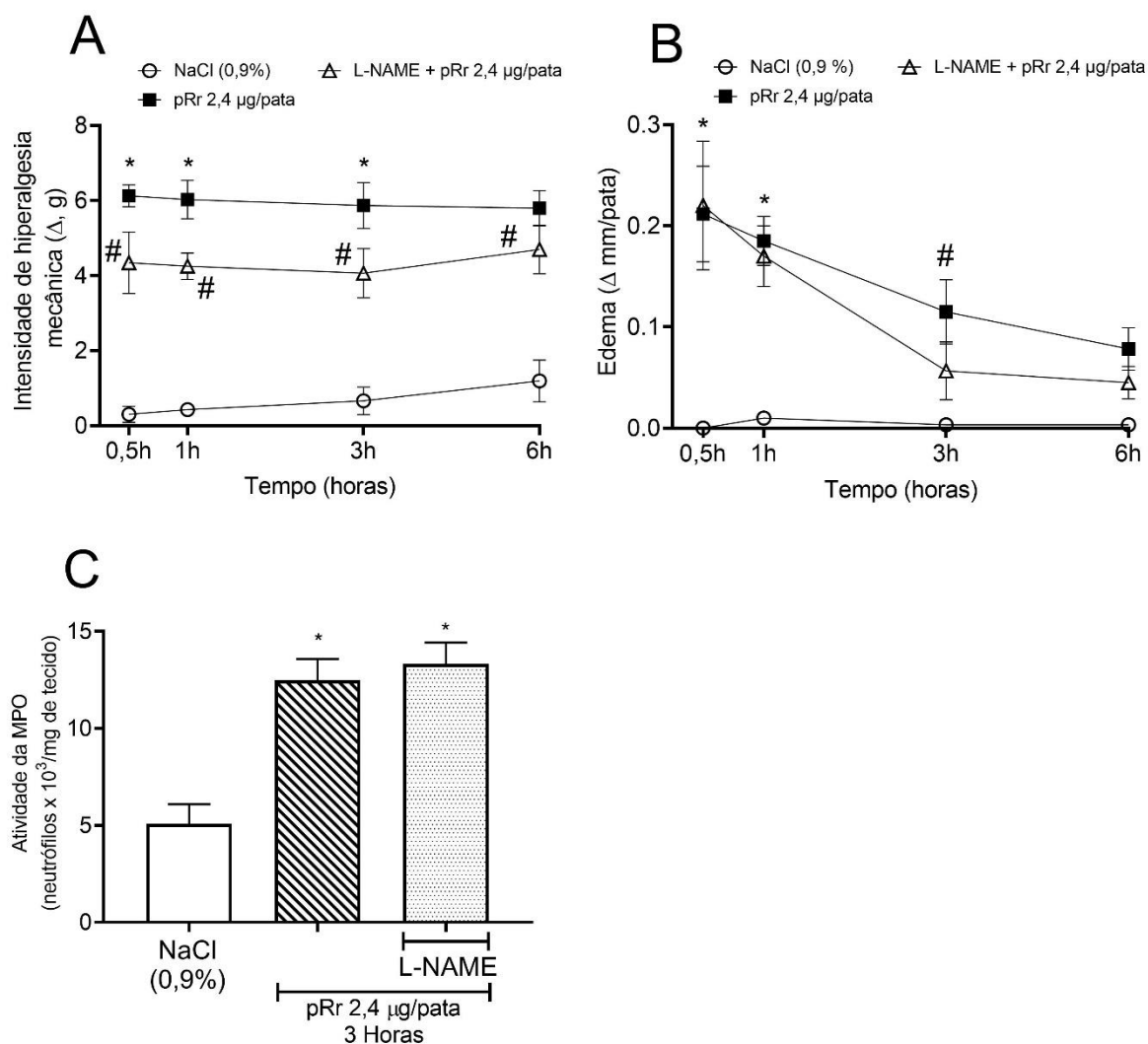


Figura 7 – Efeitos do pré-tratamento com inibidor não-seletivo de NO-sintase sobre os parâmetros fisiopatológicos induzidos pela pRr. Grupos tratados com L-NAME (10mg/kg i.p. 30 minutos antes). Em **A**, hiperalgesia mecânica. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (0,9%) e L-NAME. # $p < 0,05$ comparado ao grupo Salina (0,9%). Em **B**, edema na pata estimulada. * $p < 0,05$ comparados ao grupo Salina (0,9%). # $p < 0,05$ comparados os grupo pRr 2,4 μ g/pata e Salina (0,9%). Em **C**, atividade de MPO no tecido plantar 3 horas após estímulo com a pRr. * $p < 0,05$ comparado aos grupos salina (0,9%) e L-NAME. # $p < 0,05$ comparado ao grupo pRr. 6 animais fêmeas por grupo. Os dados foram expressos como médias \pm EPM.

DISCUSSÃO

As peçonhas de escorpiões têm efeitos inflamatórios bem descritos, sendo capazes de induzir a produção de diversos mediadores como citocinas, prostanoídes e radicais livres, que podem contribuir para as manifestações clínicas observadas, como eritema, edema e dor (PETRICEVICH, 2010). Embora a dor seja a manifestação clínica mais comum em acidentes escorpiônicos, muito pouco foi encontrado na literatura explorando o tema, especialmente considerando-se animais da escorpiofauna brasileira. Para entender melhor como as peçonhas podem induzir a dor, o presente trabalho foi desenvolvido com a peçonha de *Rhopalurus rochai* (pRr), explorando aspectos inflamatórios e relacionando-os à dor, sendo que os resultados obtidos são inéditos para a espécie. O *R. rochai*, embora seja pouco conhecido, é pertencente à família Buthidae, a mais relevante em questões clínicas, devido ao número elevado de acidentes relatados com os escorpiões representantes da mesma (BRASIL, 2020; CHIPPAUX and GOYFFON, 2008). O primeiro passo foi avaliar se pRr induziria hiperalgesia mecânica e para isso foi utilizado o método de von Frey (versão eletrônica). A pRr induziu hiperalgesia mecânica de maneira dose-dependente, sendo a dose de 2,4µg/pata, a indutora de maior intensidade de hiperalgesia e, dentro das doses avaliadas, foi a selecionada para os experimentos posteriores. Outros estudos envolvendo peçonhas de escorpião e dor também já relataram a indução de hiperalgesia mecânica, embora com as peçonhas de *T. serrulatus* e *Buthus martensi* Karsch (NASCIMENTO, 2005; PESSINI, 2008; NIU, 2013). A injeção intraplantar de pRr também induziu edema, mais um sinal clássico da inflamação, por até 3 horas após o estímulo. Nossos dados corroboram com estudos envolvendo outros escorpiões da família Buthidae (NASCIMENTO, 2005; PESSINI, 2008) e do próprio *R. rochai* (SEVERINO, 2009), embora tenha sido avaliado com um método diferente e mais sensível, o edema foi detectado por maior tempo.

A dosagem das citocinas TNF- α e IL1- β foi realizada em seguida para averiguar se a produção de tais mediadores seria estimulada pela pRr. Tanto TNF- α como IL1- β tiveram as concentrações aumentadas no tecido plantar, e, dentro dos tempos avaliados, a terceira hora foi a de maior concentração para

ambas. Tais citocinas são importantes para estimular a produção de outros mediadores inflamatórios, podendo estabelecer uma cascata de eventos (CUNHA, 2005). O aumento de citocinas pró-inflamatórias em ensaios envolvendo o escorpionismo vem sendo relatado (PETRICEVICH e PEÑA, 2002; MIYAMOTO, 2018; ZOCCAL, 2018), embora com escorpiões de outras espécies. Tratando-se do gênero *Rhopalurus*, foi encontrado um único estudo *in vivo*, no qual Yglesias-Rivera e Díaz-Gracia (2018) não observaram aumento na concentração de citocinas após a administração intraperitoneal da peçonha de *Rhopalurus junceus* (escorpião encontrado em Cuba) em camundongos. Mais recentemente, Abreu et al. (2020) observaram o aumento de IL-6 em cultura de macrófagos, após estímulo com a peçonha bruta de *Rhopalurus crassicauda* e não houve diferença nos níveis de TNF- α , embora com uma toxina isolada tenha induzido a produção desta última. Um padrão semelhante de produção das citocinas em tecido plantar de camundongos foi descrito por Cunha et al (2005), embora utilizando a carragenina como estímulo pró-inflamatório.

A pRr induziu também o recrutamento de neutrófilos para o tecido plantar após 3 horas, avaliado aqui como atividade de MPO. O influxo de leucócitos induzido por peçonhas de escorpiões é relatado principalmente envolvendo a peçonha ou, toxinas de *T. serrulatus* em cavidades peritoneais e homogenatos pulmonares (ZOCCAL, 2013; MIYAMOTO, 2018). O aumento de leucócitos no peritônio foi observado logo após 30 minutos da administração da peçonha de *Androctonus australis hector* (Aah) em camundongos, conforme descrito por Kabrine e Laraba-Djebari (2014). Em outros modelos de inflamação envolvendo estímulos como carragenina e o LPS, é conhecido o aumento da atividade da enzima em pata de camundongos (POSSADAS, 2004; PINHO-RIBEIRO, 2016). Em relação ao recrutamento de leucócitos no tecido plantar induzidos por peçonhas, os poucos estudos encontrados são em resposta a peçonhas das serpentes *Bothrops* (WANDERELEY, 2014; FELIX-DA-SILVA, 2017).

Em seguida, averiguamos a participação de alguns mediadores inflamatórios nos parâmetros utilizados no trabalho, através da aplicação de pré-tratamentos, visando modular negativamente as concentrações ou ações de tais mediadores. A administração de fármacos que inibem o NF- κ B (dexametasona e PDTC) reduziu a intensidade de hiperalgesia mecânica. A dexametasona é um glicocorticoide clássico que ao se ligar ao seu receptor intracelular, o GR, pode tanto

inibir diretamente o NF- κ B ou ainda se deslocar ao núcleo celular e induzir a expressão de I κ B, molécula que se liga ao NF- κ B no citosol e o mantém inativo (AUPHAN, 1995). Os glicocorticoides possuem ainda outras funções como induzir a expressão de anexina, que interfere na liberação de ácido araquidônico e consequente produção de eicosanoides; induz a expressão de enzima conversora de angiotensina e endotelina, regulando a pressão arterial; e induzir a expressão de genes que regulam a sinalização por receptores do tipo Toll (CAIN E CIDLOWSKI, 2017; ERCHEN, 2019). O PDTC é um fármaco mais recente em relação a dexametasona, e além de inibir o NF- κ B, através da inibição da fosforilação de I κ B, é também um antioxidante (ZHANG, 2011; PINHO-RIBEIRO, 2016). As citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo NF- κ B, destacando-se IL-1 β , TNF- α e IL-6, podem atuar de forma direta e indireta para ativar nociceptores. A IL-1 β e o TNF- α podem induzir a fosforilação de canais de sódio voltagem-dependentes (Na $_v$) através da via p38 MAPK, contribuindo para a dor (BINSHTOK et al., 2008; LEO, 2015). Ambas as citocinas podem ainda estimular a produção de outros mediadores envolvidos na hiperalgesia (VERRI, 2007). A IL-6 tem capacidade de estimular a produção de prostaglandinas e, estimular a expressão de TRPA1 e TRPV1 (CUNHA, 1992; MALSCH, 2014). Somando as atividades dessas moléculas para a indução de hiperalgesia mecânica, os pré-tratamentos com inibidores de NF- κ B reduziram a sua intensidade, assim como observaram outros estudos (TEIXEIRA, 1994; De TONI, 2015; FERRAZ, 2015), embora com peçonhas de serpentes. Foi feita ainda uma abordagem mais direta utilizando etanercepte (bloqueador de TNF- α), no qual também foi observada a diminuição da hiperalgesia mecânica em todos os tempos avaliados, o que provavelmente se deu tanto pela inibição da atuação direta nos nociceptores, quanto a sua participação na cascata de citocinas.

A participação de eicosanoides também foi avaliada, utilizando um inibidor não seletivo de COX e um inibidor seletivo de COX-2, visto que as prostaglandinas são os mediadores lipídicos mais relacionados a dor, principalmente a PGE2, a qual pode se ligar aos receptores EP nos nociceptores e induzir hiperalgesia (FERREIRA, 1978; MORIYAMA, 2005; LIN, 2006). A expressão dessas enzimas pode ser dependente de TNF- α e IL-1 β , como demonstrado em modelos animais (FEHRENBACHER, 2005; ARALDI, 2013) e células humanas (MITCHELL, 1994; CHEN, 2000). Os pré-tratamentos com ambos os fármacos reduziram a

intensidade da hiperalgesia mecânica e não houve diferença entre eles, o que sugere a maior participação de COX-2 nesse contexto. Nossos resultados diferem de Pessini et al (2008) em relação a indometacina, visto que o fármaco no presente estudo reduziu a hiperalgesia mecânica e, no trabalho citado não houve alteração em relação ao grupo estimulado com a peçonha. Tal fato pode ter ocorrido devido a diferenças entre os métodos utilizados (von Frey eletrônico e de filamentos), ou ainda pela diferença entre as peçonhas utilizadas, *Tityus serrulatus* e *Rhopalurus rochai*.

A histamina tem sido descrita como um importante mediador envolvido na dor e hiperalgesia (KHALIZADEH, 2018; TSAGARELI, 2020). O pré-tratamento com pirilamina, agonista inverso de receptores H₁, não diminuiu a intensidade de hiperalgesia mecânica nos tempos iniciais, mas diminuiu a intensidade na terceira e na sexta hora. Nossos resultados corroboram com o único estudo, até o momento, envolvendo peçonha de escorpião, hiperalgesia e histamina, sendo que a administração de pirilamina reduziu a hiperalgesia mecânica induzida por *Buthus martensi* Karsch em 5 e 8 horas após a inoculação (LIU, 2007). Em se tratando de peçonhas de outros animais e o uso de antagonistas de H₁, Lauria et al (2018) observaram a redução da hiperalgesia mecânica induzida pela peçonha da aranha *Latrodectus curacaviensis* somente nas 6^a e 24^a hora, o que coincide com nossos resultados obtidos na sexta hora. Outros trabalhos avaliaram ainda toxinas de serpentes e a participação de histamina. Bernardes et al (2015) observaram redução da hiperalgesia mecânica somente no pico de intensidade (3 horas) com o pré-tratamento com pirilamina, no qual inocularam uma metaloproteinase de *Bothrops pirajai*. Queiroz et al (2011) constataram a redução de hiperalgesia mecânica induzida por uma miotoxina de *Bothrops moojeni*, após o tratamento com antagonista do receptor H₁. Uma possível explicação para as observações divergentes nos tempos iniciais seria o envolvimento de outros receptores de histamina na hiperalgesia induzida pela pRr, visto que o fármaco utilizado atua somente no H₁, sendo possível a atuação da histamina em outros receptores que têm envolvimento na hiperalgesia mecânica, como H₄ (MOGILSKI, 2017).

A produção de óxido nítrico é comum em processos inflamatórios como já descrito em outros trabalhos (GUZIK, 2003), mas a sua relação com a hiperalgesia mecânica ainda não é totalmente esclarecida (CURY, 2011). O pré-tratamento com L-NAME, inibidor não-seletivo de NO-sintase, diminuiu a intensidade

de hiperalgesia, exceto na sexta hora após a administração da pRr. Estudos envolvendo peçonhas, hiperalgesia mecânica e o óxido nítrico são escassos. Liu et al (2008) observaram a redução da hiperalgesia mecânica em 5 e 8 horas após estímulo com a peçonha de *Buthus martensi* Karsch, utilizando o pré-tratamento com L-NAME. Porém, há diferenças entre as metodologias, como: via de administração, modelo animal e equipamento para medição de hiperalgesia mecânica. Estudos envolvendo peçonhas de outros animais também avaliaram a participação do NO na hiperalgesia mecânica. Zanchet et al (2004) utilizaram a peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*, sendo que os tratamentos com um inibidor de iNOS reduziram a intensidade de hiperalgesia em 1 e 2 horas após o estímulo. O pré-tratamento com L-NAME reduziu parcialmente (6^a e 24^a horas) a hiperalgesia mecânica induzida pela peçonha da serpente *Bothrops leucurus* (MAIA-MARQUES, 2021). Porém, apesar dos dados apresentados, segundo o trabalho de Gomes et al (2020), o NO teria maior efeito analgésico do que hiperalgésico, pois a sua via de produção é estimulada por vários fármacos analgésicos, o que culmina no efluxo de K⁺ e hiperpolarização de nociceptores.

Como destacado anteriormente, tais mediadores inflamatórios têm a capacidade de induzir dor diretamente ou ainda, sensibilizar os nociceptores levando a hiperalgesia. Os mecanismos envolvidos na hiperalgesia mecânica ainda não são completamente esclarecidos, mas alguns trabalhos relatam a participação dos canais TRPV1 (FUJII, 2008; WATANABE, 2015; GUO, 2019). Esses canais podem ser ativados por diversas substâncias como capsaicina, prótons e toxinas. Mediadores inflamatórios como citocinas, prostanoídes e histamina são capazes de ativar quinases (PKA e PKC), que por sua vez fosforilam os TRPV1, resultando no influxo de cálcio e despolarização do nociceptor (DEVESA, 2011). Mais recentemente, a caracterização e os estudos envolvendo os canais iônicos PIEZO, têm associado a sua participação em estímulos mecânicos nocivos (MURTHY, 2018).

Além dos aspectos de excitabilidade de fibras nervosas periféricas observados no tópico anterior, a pRr induziu edema na pata por até 3 horas após estímulo e, também, aumento da atividade de MPO em 3 horas, indicando a migração de neutrófilos. Nossos resultados corroboram com Severino et al (2009), que também avaliaram o edema induzido pela pRr, sendo que o maior volume de edema foi observado em 30 minutos em ambos os trabalhos. Porém, o edema

observado em nossos experimentos não permaneceu por mais que 3 horas, diferindo do trabalho citado, que permaneceu por até 24 horas, o que provavelmente se deu pelo uso de técnicas diferentes de medição de edema, sendo que utilizamos um método menos sensível. Padrão de edema semelhante aos dados aqui apresentados foi observado por Santos-da-Silva et al (2017). Embora utilizando as peçonhas de *T. serrulatus* e *T. obscurus*, eles observaram maiores volumes de edema na pata em 15 e 30 minutos, e na 4ª hora não havia mais edema. Também com a peçonha de *T. serrulatus*, Pessini et al (2008) observaram edema até a 5ª hora. Em se tratando de atividade de MPO em tecido plantar após estímulo com peçonha escorpiônica, não encontramos artigos na literatura. Porém, em outros tecidos, como o pulmão (MIYAMOTO, 2018) e rins (SAIDANI, 2018), o aumento de MPO já foi relatado em resposta às peçonhas de *T. serrulatus*, *T. bahiensis* e *Androctonus australis hector*. Estudos com peçonhas de serpentes também relataram o aumento da atividade de MPO no tecido plantar (WANDERLEY, 2014; FÉLIX-SILVA, 2017).

O pré-tratamento com inibidores de NF- κ B inibiu o edema. O NF- κ B participa da expressão de mediadores inflamatórios produzidos pelas células imunes, como as citocinas, prostanoídes e espécies reativas de oxigênio, que podem induzir o aumento da permeabilidade vascular, estimulando a expressão de moléculas de adesão como E-selectina e ICAM-1 em células endoteliais; induzindo vasodilatação; ou ainda, em concentrações elevadas podem causar lesões nos vasos sanguíneos, culminando na formação de edema (SPRAGUE e KHALIL, 2009). A participação do NF- κ B no edema induzido por peçonhas escorpiônicas foi pouco explorada até o momento. No estudo realizado por Nascimento et al (2005), o tratamento com dexametasona não reduziu o edema na pata de ratos induzidos pela peçonha do *T. serrulatus*. Já os estudos envolvendo peçonhas de serpentes, ou componentes das peçonhas, são mais comuns. O pré-tratamento com dexametasona diminuiu o edema induzido por uma metaloproteinase da serpente *Bothrops pirajai* em pata de ratos, em todos os tempos avaliados (BERNARDES, 2015); o fármaco também diminuiu o edema induzido pela peçonha de *Bothrops lanceolatus* (LOBO de ARAÚJO, 2000) em pata de camundongos; assim como reduziu o edema na pata induzido pela peçonha de *Lachesis muta rhombeata* (SOARES de MOURA, 1998).

Os inibidores de COX também inibiram tal evento, exceto no tempo de 30 minutos para o inibidor seletivo de COX-2 (celecoxibe). Nossos resultados diferem de Pessini et al (2008) no qual observaram redução de edema somente com o tratamento com celecoxibe, e não com indometacina, tendo a peçonha de *T. serrulatus* como estímulo. Diferem também de Nascimento et al (2005), no qual não houve diferença entre o grupo estimulado com a peçonha de *T. serrulatus* e o grupo tratado com indometacina, embora com ratos. Olivo et al (2007) avaliaram as peçonhas das serpentes *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca*, sendo que o pré-tratamento com indometacina reduziu o edema em ambos os grupos de camundongos. Utilizando a peçonha de *Bothrops jararacussu*, Wanderley et al (2014) observaram a diminuição no edema da pata de camundongos após o pré-tratamento com indometacina e celecoxibe, exceto nos primeiros 30 minutos.

A administração de pirilamina diminuiu o edema somente após 30 minutos, enquanto o L-NAME não diminuiu o edema em nenhum dos tempos avaliados. Nascimento et al (2005) relataram a diminuição no edema de pata entre os grupos de ratos estimulados com a peçonha de *T. serrulatus* e os tratados com prometazina e ciproheptadina (antagonistas de H₁) até o tempo de 1 hora após estímulo. Em outro estudo realizado com a peçonha do escorpião *Buthus martensi* Karsch, Liu et al (2007) reportaram o efeito inibidor da pirilamina sobre o edema de pata por até 8 horas. Os nossos resultados sugerem que a histamina teve participação nos primeiros 30 minutos de edema, mas que em tempos mais avançados, ou a histamina *per se* não é importante no edema desencadeado pela pRr, ou o receptor H₁ não está envolvido no mesmo, visto que a histamina poderia atuar em outros receptores, como o H₄, como demonstrado por Mogilski et al (2017) utilizando estímulos clássicos para a indução de edema (carragenina e zimosan). Assim como a histamina, o NO é um potente vasodilatador (FORSTERMANN e SESSA, 2012) e estudos já relataram a sua produção induzida por peçonhas de escorpião (PETRICEVICH e PEÑA, 2002; SAIDI, 2018). Entretanto, a inibição das NO-sintases não interferiu no edema induzido pela pRr, divergindo de Pessini et al (2008) que observaram redução parcial do edema induzido pela peçonha de *T. serrulatus* (15 e 30 minutos). Todavia, Severino et al (2009) utilizando a mesma dose do fármaco observaram aumento do edema induzido pela peçonha de *T. serrulatus*. Tal incongruência pode ter ocorrido devido às diferenças de modelos animais e concentrações da peçonha.

A migração de leucócitos para o tecido lesionado é uma importante característica do processo inflamatório, reforçando a resposta frente a um estímulo nocivo. Os neutrófilos são os primeiros e mais abundantes leucócitos a migrarem para o foco de inflamação, realizando fagocitose, produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A enzima MPO é expressa em neutrófilos, sendo responsável por produzir intermediários de espécies reativas de oxigênio, como o HOCl e o HOBr (KATO, 2016) e, a sua dosagem é utilizada como indicador indireto de migração de neutrófilos para o tecido acometido. De fato, trabalhos já constataram o influxo de neutrófilos em tecidos pulmonares de camundongos após estímulo com a peçonha de *T. serrulatus* (COELHO, 2007; PERES, 2009; ZOCCAL, 2016). A pRr induziu o aumento da atividade da MPO na pata 3 horas após o estímulo. Estudos abordando o estímulo com peçonhas na pata de murinos e a relação com aumento de MPO são escassos. Em relação a atividade de MPO, Félix-Silva et al (2017) observaram aumento 2 horas após estímulo com a peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* em patas de camundongos; assim como Wanderley et al (2014) relataram aumento em resposta a peçonha de *Bothrops jararacussu*, 4,5 horas após a administração. Calixto et al (2003) observaram ainda o aumento de MPO após estímulo com a peçonha da abelha *Apis mellifera* em 6 horas. Apesar da escassez de estudos explorando modulações farmacológicas e a atividade de MPO, outros modelos de inflamação com estímulos diferentes, utilizaram tratamentos farmacológicos semelhantes. Em nosso estudo, os inibidores de NF- κ B (dexametasona e PDTC) reduziram a atividade da MPO para níveis basais. O tratamento com dexametasona também reduziu a atividade de MPO induzida por carragenina (RIELLA, 2012; ZHANG, 2018) e o PDTC inibiu as atividades de MPO e induzida por KO₂ (PINHO-RIBEIRO, 2016). Celecoxibe e indometacina diferiram nesse parâmetro, sendo que apenas o inibidor seletivo de COX-2 reduziu a atividade de MPO e a indometacina não, embora tenha ocorrido tendência de diminuição com o uso da indometacina. Em outros modelos de inflamação, inibidores de COX reduziram a atividade de MPO 4,5 horas após estímulo com a peçonha de *Bothrops jararacussu* (WANDERLEY, 2014) e, 3 horas após estímulo com carragenina em patas de ratos (HADDADI e RASHTIANI, 2020). A indometacina reduziu a atividade de MPO 5 horas em patas de camundongos em resposta a carragenina (CALIXTO-CAMPOS, 2014).

O bloqueio de TNF- α não alterou a atividade de MPO induzida pela

pRr, semelhante ao resultado obtido por Wanderley et al (2014), embora utilizando a peçonha de *B. jararacussu* e outro fármaco anti-TNF- α (infliximabe). Os tratamentos com pirilamina não tiveram efeito na atividade de MPO. Calixto et al (2003) obtiveram resultado divergente utilizando antagonista de receptor H₁, onde observaram a diminuição da atividade de MPO em comparação com peçonha de abelha e carragenina, 6 horas após o estímulo. O L-NAME reduziu a atividade de MPO em resposta a enterotoxina estafilocócica B, sendo feita a dosagem após 4 horas do estímulo (FRANCO-PENTEADO, 2001) tendo os autores feito a relação entre a diminuição do fluxo microsvacular como fator para a diminuição do recrutamento de neutrófilos, o que não ocorreu em nossos resultados.

O NF- κ B está envolvido na expressão vários mediadores inflamatórios, como citocinas e prostanoídes, que induzem a expressão de moléculas de adesão, ativam células endoteliais e induzem quimiocinas que estimulam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (MUSSBACHER, 2019) e a inibição da atividade de MPO sugerem essa importância na inflamação induzida pela pRr. Surpreendentemente, o bloqueio de TNF- α não alterou as atividades da enzima citada, visto que essa citocina tem capacidade de induzir E-selectina e ICAM-1, por exemplo, moléculas de adesão importantes para a migração de leucócitos (RAHMAN, 1998; READ, 2001; KIM, 2008); entretanto, a expressão dessas moléculas é induzida pelo NF- κ B, que pode ser ativado por outras citocinas. A participação de prostaglandinas na migração de leucócitos é complexa. Por um lado, os diferentes tipos de prostaglandinas podem ter papéis diferentes em regular moléculas de adesão em células endoteliais (KE, 2017) e, por outro, podem induzir a expressão de moléculas como IL-8 (YU e CHADEE, 1998) e MCP-1 (NAKAYAMA, 2006), quimioatraentes para neutrófilos e macrófagos, o que sugere que cada contexto de inflamação pode ter respostas diferentes. A histamina participa da migração de leucócitos induzindo a mobilização de P-selectina, molécula de adesão pré-formada em células endoteliais, para sua membrana (BURNS, 1999); e induzindo a expressão de MCP-1 (YAMAUCHI, 2007). Porém, no tempo avaliado nesse trabalho (3 horas), o receptor H₁ parece não estar envolvido. O NO tem também funções diferentes no recrutamento de leucócitos dependendo do tecido. Em modelos de peritonite, a inibição de NO-sintases aumentou o influxo de leucócitos (TAVARAES-MURTA, 2001; LEITE, 2009), enquanto que diminuiu em

articulações, o que pode ter ocorrido devido a sua relação com produção de LTB₄, quimiotraente para neutrófilos (LEITE, 2009; TAKAHASHI, 2019). Nossos resultados sugerem que a participação de NO na migração de neutrófilos não é importante com o estímulo da pRr.

Estudos explorando aspectos inflamatórios em tecidos periféricos estimulados por peçonhas escorpiônicas são ainda pouco realizados, principalmente se levarmos em conta a alta frequência de acidentes envolvendo as diferentes espécies desse aracnídeo. Nossos resultados são os primeiros em relação a efeitos fisiopatológicos (além do edema) induzidos pela peçonha do escorpião *Rhopalurus rochai*, sendo que demonstramos o potencial inflamatório, assim como a participação de alguns mediadores inflamatórios que contribuem para desenvolver tais características.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho contribuiu para o entendimento de aspectos inflamatórios induzidos por peçonhas escorpiônicas, sendo o primeiro a explorar a peçonha do *Rhopalurus rochai* (pRr) em aspectos inflamatórios, além do edema. A dor e a hiperalgesia, embora sejam os sintomas mais comuns em acidentes escorpiônicos, são pouco investigadas no campo acadêmico. Esse trabalho demonstrou que a pRr induziu hiperalgesia mecânica, edema e recrutamento de neutrófilos para a pata de camundongos. Em resumo, nossos dados sugerem a participação do NF- κ B, TNF- α e COX na hiperalgesia mecânica e no edema de pata; e a participação de NF- κ B, COX-2 no recrutamento de neutrófilos para o tecido.

REFERÊNCIAS

ADI-BESSALEM, S. et al. Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: Tissue damages and inflammatory response. **Experimental and Toxicological Pathology**, v. 60, n. 4-5, p. 373-380, ago. 2008.

ABDEL-HALEEM, A. A. H. et al. Serum levels of IL-6 and its soluble receptor, TNF- α and chemokine RANTES in scorpion envenomed children: Their relation to scorpion envenomation outcome. **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 437-444, mar. 2006.

AMORIM, F. G. et al. Proteome of fraction from *Tityus serrulatus* venom reveals new enzymes and toxins. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, Botucatu, v. 25, e148218, 2019. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167891992019000100308&lng=en&nrm=iso>. acesso em 18 Junho de 2020. Epub Abr. 18, 2019.

ARALDI, D. et al. Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. **PNAS**, v. 110, n. 9, p. 3603-3608, fev. 2013.

ARBUCKLE, K. Evolutionary context of venom in animals. **Evolution of venomous animals and their toxins**, p. 3-31, mar. 2017.

AUPHAN, N. et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. **Science**, v. 270, n.5234, p. 286-290, out. 1995.

BARAL, P. et al. Pain and Immunity: Implications for host defence. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 19, n. 7, p. 433-447, jul. 2019.

BERNARDES, C. P. et al. Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom. **Mol. Immunol.**, v. 68, p. 456-464, dez. 2015.

BINSHTOK, A. M. et al. Nociceptors are Interleukin-1 β sensors. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 52, p. 14062-14073, dez. 2008.

BONAVITA, A. G. C. et al. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v.47, n. 8, p.885-893, jun. 2006.

BORGES, A. et al. Specific activation of human neutrophils by scorpion venom: A flow cytometry assessment. **Toxicology in vitro**, v. 25, n.1, p.358-367, fev. 2011.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN R. D.; ROTHSTEIN G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, set. 1982.

BRANDÃO, R. A.; FRANÇOSO, R. D. Acidente por *Rhopalurus agamemnon*

(Koch, 1839) (Scorpiones, Buthidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 342-344, jun. 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de controle de escorpiões. Brasília, DF, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>> Acesso em 15 abril de 2020.

BUCARETCHI, F. et al. Comparative Study of Severe Scorpion Envenomation in Children Caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 331-336, ago. 1995.

BUCARETCHI, F. et al. Clinical Consequences of *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* Scorpion Stings in the Region of Campinas, Southeastern Brazil. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 89, p.17-25, 2014.

BURNS, A. R. et al. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 3, p. 299-306, mar. 1999.

CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune Regulation by Glucocorticoids. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 233-247, abr. 2017.

CALIXTO, M. C. et al. Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis mellifera* bee. **Inflammation Research**, v. 52, n. 3, p. 132-139, mar. 2003.

CALIXTO-CAMPOS, C. et al. Vanillic Acid Inhibits Inflammatory Pain by Inhibiting Neutrophil Recruitment, Oxidative Stress, Cytokine Production, and NFκB Activation in Mice. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 1799-1808, ago. 2015.

CARVALHO, L. S. Escorpionismo na zona rural de Teresina, Estado do Piauí: relato de casos de envenenamento. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 40, n. 4, 491, jul-ago 2007.

CEARÁ, Secretaria da Saúde. Boletim entomológico: Vigilância dos escorpiões. P. 1-13, ago. 2018.

CHEN, C. C. et al. TNF- α induced cyclooxygenase-2 expression in human epithelial cells: involvement of the phospholipase C- γ 2, protein kinase C- α , tyrosine kinase, NF- κ B inducing kinase, and I- κ B kinase 1/2 pathway. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2719-2728, set. 2000.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, jan. 2018.

COELHO, F.M. et al. Platelet Activating Factor Receptors Drive CXC Chemokine Production, Neutrophil Influx and Edema Formation in the Lungs of Mice Injected with

Tityus serrulatus Venom. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, v. 50, p. 420-427, 2007.

COLLAÇO, R. C. et al. Scorpion venom increases acetylcholine release by prolonging the duration of somatic nerve action potentials. **Neuropharmacology**, v. 153, p. 41-52, abril 2019.

CUNHA, F.Q., et al. The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660-664, nov. 1992.

CUNHA, T.M., et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 37 n. 3, p. 401-407, mar. 2004.

CUPO, P. Clinical Update on Scorpion Envenoming. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v, 48, n. 6, p. 642-649, dez. 2015.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, n. 3, p. 243-254, out. 2011.

DE TONI, L. G. B. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 199-207, set. 2015.

DEUIS et al. Analgesic Effects of GpTx-1, PF-04856264 and CNV1014802 in a Mouse Model of NaV 1.7-Mediated Pain. **Toxins (Basel)**, v. 8, n.3, mar. 2016.

DEVESA, I. et al. Role of the transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and sepsis. **Journal of Inflammation Research**, v. 2011, n. 4, p. 67-81, maio 2011.

DÍAZ-GARCÍA, A. et al. Enzymatic analysis of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. **Journal of venom research**, v. 6, p. 11-18, jul. 2015.

DIAZ, C. et al. Venom characterization of the bark scorpion *Centruroides edwardsii* (Gervais 1843): Composition, biochemical activities and in vivo toxicity for potential prey, **Toxicon**, v. 171, n. 7, p. 7-19, out. 2019.

D'SUZE, G. et al. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, n. 3, p. 367-375, mar. 2003.

ERCHEN, J. M. et al. More than suppression: glucocorticoids action on monocytes and macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2028, doi: 10.3389/fimmu.2019.02028, ago. 2019.

FEHRENBACHER, J. C. et al. Tumor necrosis factor α and interleukin-1 β stimulate the expression of cyclooxygenase II but do not alter prostaglandin E2 receptor mRNA

- levels in cultured dorsal root ganglia cells. **Pain**, v. 113, n. 1-2, p. 113-122, jan. 2005.
- FÉLIX-SILVA, J. et al. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v. 125, p. 74-83, jan. 2017.
- FERRAZ, C. R. et al. Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF- α , IL-1 β and NF- κ B in mice. **Toxicon**, v. 103, p. 119-128, set. 2015.
- FERREIRA, S. H. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. **Prostaglandins**, v. 16, n. 1, p. 31-37, jul. 1978.
- FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 β as a potente hyperalgesic agente antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, p. 698-700, ago. 1988.
- FERREIRA, T. et al. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 69-77, jan. 2009.
- FIALHO, E.M.S. et al. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 58, n. 6-7, p.480-485, nov. 2011.
- FISZON, J. T.; BOCHNER, R. Subnotificação de acidentes por animais peçonhentos registrados pelo SINAN no Estado do Rio de Janeiro no período de 2001 a 2005. **Rev. Bra. Epidemio.**, v. 11, n. 1, p. 114-127, 2008.
- FORSTERMANN, U.; SESSA, W. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, abr. 2012.
- FRANCO-PENTEADO, C. F. et al. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 10, p. 1305-1311, maio 2001.
- FREIRE-MAIA, L.; MATOS, I. M. Heparin or a PAF Antagonist (BN 52021) Prevents the Acute Pulmonary Edema Induced by *Tityus serrulatus* Scorpion Venom in the Rat. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 31, p.1207-1210, 1993.
- FUENTES-SILVA, D. et al. Envenomation caused by *Rhopalurus amazonicus* Lourenço, 1986 (Scorpiones, Buthidae) in Pará State, Brazil. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 20, n. 52, dez. 2014
- FUJII, Y. et al. TRP channels and ASICs mediate mechanical hyperalgesia in models of inflammatory muscle pain and delayed onset muscle soreness. **Pain**, v. 140, n. 2,

p. 292-304, nov. 2008.

FUKUHARA, Y. D. M. et al. Increased plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 49-55, jan. 2003.

GOMES, F. I. F. et al. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. **Biochemical Pharmacology**, v. 176, doi: 10.1016/j.bcp.2020.113862, jun. 2020.

GOYFFON, M.; TOURNIER, J. N. Scorpions: a presentation. **Toxins**, v. 6, n. 7, p. 2137-2148, jul. 2014.

GUO, S.H. et al. Silencing of spinal Trpv1 attenuates neuropathic pain in rats by inhibiting CAMKII expression and ERK2 phosphorylation. **Scientific Reports**, v. 9, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39184-4>, fev. 2019.

GUZIK, T. J. et al. Nitric Oxide And Superoxide In Inflammation And Immune Regulation. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 54, n. 4, p. 469-487, dez. 2003.

HADDADI, R.; RASHTIANI, R. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of milnacipran in infamed rats: involvement of myeloperoxidase activity, cytokines and oxidative/nitrosative stress. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 903-913, ago. 2020.

JALALI, A. et al. Serum TNF- α levels reflect the clinical severity of envenomation following a Hemiscorpius lepturus sting. **European Cytokine Network**, v. 22, n. 1, p. 5-10, mar. 2010.

KABRINE, M.; LARABA-DJEBARI, F. Immunomodulatory and Protective Properties of Tacrolimus in Experimental Scorpion Envenomation. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 69-78, jan. 2014.

KATO, Y. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. **J. Clin. Biochem. Nutri.**, v. 58, n. 2, p. 99-104, mar. 2016.

KAWABATA, A. Prostaglandin E₂ and pain – na update. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1170-1173, ago. 2011.

KE, Y. et al. Effects of prostaglandin lipid mediators on agonist-induced lung endothelial permeability and inflammation. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 313, n. 4, p. 710-721, jun. 2017.

KHALIZADEH, E. et al. Evaluation of different classes of histamine H1 and H2 receptor antagonist effects on neuropathic nociceptive behavior following tibial nerve

transection in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 834, p. 221-229, set. 2018.

KHATTABI, A. et al. Classification of Clinical Consequences of Scorpion Stings: Consensus Development. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 105, p. 364-369, 2011.

KIM, H. et al. TNF- α -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 40, n. 2. P. 167-175, abr. 2008.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M. et al. Mast cell: a multi-functional master cell. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 620, jan. 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LAURIA, P. S. S. et al. Pain-like behaviors and local mechanisms involved in the nociception experimentally induced by *Latrodectus curacaviensis* spider venom. **Toxicology letters**, v. 299, p. 67-75, dez. 2018.

LEITE, A. C. R. M. et al. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: role of leukotriene B4 and adhesion molecules. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 5, p. 818-825, mar. 2009.

LEO, M. et al. Modulation of Voltage-Gated Sodium Channels by Activation of Tumor Necrosis Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Small DRG Neurons of Rats. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, doi: 10.1155/2015/124942, out. 2015.

LIN, C. R. et al. Prostaglandin E2Receptor EP4 Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 3, p. 1096-1103, set. 2006.

LIU, T. et al. Degranulation of mast cells and histamine release involved in rat pain-related behaviors and edema induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. **European Journal of Pharmacology**, v. 575, n. 1-3, p. 46-56, ago. 2007.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, jul. 2017.

LÔBO de ARAÚJO, A. et al. Bothrops lanceolatus(Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 209-221, fev. 2000.

LOURENÇO, W. R. The Evolution and Distribution of Noxious Species of Scorpions (Arachnida: Scorpiones). **Journal of Venomous Animals and Toxins including**

Tropical Diseases, v. 24, p. 1-12, 2018.

LOURENCO-GONZALEZ, Y. et al. Repurposing of the Nootropic Drug Vinpocetine as an Analgesic and Anti-Inflammatory Agent: Evidence in a Mouse Model of Superoxide Anion-Triggered Inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2019, mar. 2019.

MAGALHÃES, M. M. et al. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**, v. 37, n. 8, p. 1155-1164, ago. 1999.

MAIA-MARQUES, R. et al. Inflammatory mediators in the pronociceptive effects induced by Bothrops leucurus snake venom: The role of biogenic amines, nitric oxide, and eicosanoids. **Toxicology**, v. 448, DOI: 10.1016/j.tox.2020.152649, jan. 2021.

MAIOLI, N. A. et al. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 321-331, nov. 2014.

MALANGE, K. F. et al. *Tabebuia aurea* decreases hyperalgesia and neuronal injury induced by snake venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, n. 1, p. 131-140, abr. 2018.

MALSCH, P. et al. Deletion of Interleukin-6 Signal Transducer gp130 in Small Sensory Neurons Attenuates Mechanonociception and Down-Regulates TRPA1 Expression. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 30, p. 9845-9856, jul. 2014.

MENDES, D. A. G. B. et al. *In vivo* participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 687, n. 1-3, p. 1-8, abr. 2012.

MITCHELL, J. A. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, n. 3, p. 1008-1014, nov. 1994.

MIYAMOTO, J. G. et al. A Comparative Study of Pathophysiological Alterations in Scorpionism Induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* Venoms. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 141, p. 25-33, 2018.

MIZOKAMI, S.S. et al. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO-Cyclic GMP-Protein Kinase G-ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 896-904, maio 2012.

MOGILSKI, S. et al. Aryl-1,3,5-triazine ligands of histamine H4receptor attenuate inflammatory and nociceptive response to carrageen, zymosan and lipopolysaccharide. **Inflammation Research**, v. 66, n. 1, p. 79-95, jan. 2017.

MORIYAMA, T. et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Molecular pain**, v. 1, n. 3, jan. 2005.

MURTHY, S. E. et al. The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. **Sci. Transl. Med.**, v. 10, n. 462, doi: 10.1126/scitranslmed.aat9897., out. 2018.

MUSSBACHER, M. et al. Cell Type-Specific Roles of NF-κB Linking Inflammation and Thrombosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 85, doi: 10.3389/fimmu.2019.00085, fev. 2019.

NADUR-ANDRADE, N. et al. Analgesic Effect of Photobiomodulation on Bothrops Moojeni Venom-Induced Hyperalgesia: A Mechanism Dependent on Neuronal Inhibition, Cytokines and Kinin Receptors Modulation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 10, e0004998.doi:10.1371/journal.pntd.0004998. Out. 2016.

NAKAYAMA, T. et al. Prostaglandin E2promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. 1, p. 95-104, jan. 2006.

NASCIMENTO Jr., E. B. et al. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 45, n. 5. p. 585-593, abr. 2005.

NIU, Q. S. et al. Microglial activation of p38 contributes to scorpion envenomation-induced hyperalgesia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 3, p. 374-380, out. 2013.

OKAMOTO, C. K. et al. *Ctenus medius* and *Phoneutria nigriventer* Spiders Venoms Share Noxious Proinflammatory Activities. **J. Med. Entomol.**, v. 46, n. 1, p. 58-66, jan. 2009.

OLIVO, R. A. et al. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 670-677, abr. 2007.

PERES, A. C. P. Effects of *Tityus Serrulatus* Scorpion Venom on Lung Mechanics and Inflammation in Mice. *Toxicon: Official journal of the International Society on Toxinology*, v. 53, p. 779-785, fev. 2009.

PESSINI, A.C. et al. Time Course of Acute-phase Response Induced by *Tityus serrulatus* Venom and TsTX-I in Mice. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 765–774, 2003.

PESSINI, A. C. et al. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 729-736, dez. 2008.

PETRICEVICH, V. L. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 1, p. 23-31, fev. 2002.

PETRICEVICH, V. L.; PENA, C. F. The Dynamics of Cytokine and Nitric Oxide Secretion in Mice Injected with *Tityus serrulatus* Scorpion Venom. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 173–180, 2002.

PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory Effects of the *Tityus serrulatus* Venom on Murine Macrophage Functions in Vitro. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 1, p. 39-49, fev. 2005.

PETRICEVICH, V. L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, doi: 10.1155/2010/903295. Mar. 2010.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in the paw skin and spinal cord by targeting NF- κ B and oxidative stress. **Inflammopharmacology**, v. 24, n. 2-3, p. 97-107, jun. 2006.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 33, p. 8-14, jul. 2016.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends Immunol.**, v. 38, n. 1, p. 5-19, jan. 2017.

PORTO, T. J. et al. Scorpions, state of Bahia, northeastern Brazil. Check list: journal of species lists and distribution, v. 6, n. 2, p. 292-297, 2010.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, maio 2004.

PUCCA, M. B. et al. Scorpionism and Dangerous Species of Brazil. **Toxinology**, p. 1-24, 2014.

QUEIROZ, M. R. et al. Biological characterization of a myotoxin phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 49-58, dez. 2010.

RAHMAN, A. et al. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF- α -induced oxidant generation and NF- κ B activation. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 3, p.

533-544, set. 1998.

READ, M. A. et al. Tumor Necrosis Factor- α -Induced E-selectin Expression Is Activated by the Nuclear Factor- κ B and c-JUN N-terminal Kinase/p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 5, p. 2753-2761, jan. 1997.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, maio 2011.

RIELLA, K. R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, set. 2012.

SAIDANI, C. et al. Kidney inflammation and tissue injury induced by scorpion venom: comparison with a nephrotoxic model. **Toxin Reviews**, v. 38, n. 3, p. 240-247, mar. 2018.

SAIDI, H. et al. Involvement of Alveolar Macrophages and Neutrophils in Acute Lung Injury After Scorpion Envenomation: New Pharmacological Targets. **Inflammation**, v. 41, n. 3, p. 773-783, jun. 2018.

SANTOS, M. S. V. et al. Clinical and Epidemiological Aspects of Scorpionism in the World: A Systematic Review. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 27, p. 504–518, 2016.

SANTOS-da-SILVA, A. P. Some pharmacological effects of *Tityus obscurus* venom in rats and mice. **Toxicon**, v. 126, doi: 10.1016/j.toxicon.2016.12.008., p.51-58, fev. 2017.

SEDDER, L. M.; McDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453-472, ago. 2014.

SEVERINO, D. N. Edematogenic Activity of Scorpion Venoms from the Buthidae Family and the Role of Platelet-Activating Factor and Nitric Oxide in Paw Edema Induced by *Tityus* Venoms. **Inflammation**, v. 32, n.1, p. 57-64, fev. 2009.

SMITH, F. M. et al. Role of Histamine H3 and H4 Receptors in Mechanical Hyperalgesia following Peripheral Nerve Injury. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 6, p. 317-325, abr. 2008.

SOARES de MOURA, R. et al. Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, v. 36, n. 5, p. 771-780, maio 1998.

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction

and Vascular Disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 78, n. 6, p. 539-552, set. 2009.

TAKAHASHI, M. et al. The phytosphingosine-CD300b interaction promotes zymosan-induced, nitric oxide-dependent neutrophil recruitment. **Science Signaling**, v. 12, n. 564, já. 2019.

TAVARES-MURTA, B. M. et al. Nitric Oxide Mediates the Inhibition of Neutrophil Migration Induced by Systemic Administration of LPS. **Inflammation**, v. 25, n. 4, p. 247-253, ago. 2001.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Hyperalgesia induced by Bothrops jararaca venom in rats > role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, v. 32, n. 4, p. 419-426, abr. 1994.

THANGAM, E. B. et al. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and inflammation: The Hunt for new Therapeutic Targets. **Frontiers in Immunology**, v. 9, ago. 2018.

TOBASSUM, S., et al. Nature and applications of scorpion venom: an overview. **Toxin Reviews**, v. 39, n. 3, jun. 2018.

TSAGARELI, M. G. et al. Thermal Hyperalgesia and Mechanical Allodynia Elicited by Histamine and Non-histaminergic Itch Mediators: Respective Involvement of TRPV1 and TRPA1. **Neuroscience**, v. 449, p. 35-45, nov. 2020.

VASCONCELOS, F., et al. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, n. 1, p. 85-92, maio 2005.

VERRI Jr., W. A. et al. Nociceptive Effect of Subcutaneously Injected Interleukin-12 Is Mediated by Endothelin (ET) Acting on ETB Receptors in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 2, p. 609-615, jul. 2005.

VERRI Jr., W. A. et al. Cytokine Inhibitors and Pain Control. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 5, out. 2007.

YAMAUCHI, Y. et al. The Effect of H1 Antagonists Carebastine and Olopatadine on Histamine Induced Expression of CC Chemokines in Cultured Human Nasal Epithelial Cells. **Allergology International**, v. 56, n. 2, p. 171-177, jun. 2007.

YGLESIAS-RIVERA, A.; DÍAZ-GARCÍA, A. Effect of *Rhopalurus junceus* scorpion venom on inflammation-related cytokines in healthy BALB/C mice. **Ann. Microbiol. Immunol.**, v. 1, n. 2, set. 2018.

YU, Y.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression. In human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 7, p. 3746-3752, out. 1998.

WALLEZ, Y; HUBER, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, n. 3, p. 794-809, mar. 2008.

WANDERLEY, C. W. S. et al. Bothrops jararacussu snake venom induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134- 147, nov. 2014.

WARD, M. J. et al. A global accounting of medically significant scorpions: Epidemiology, major toxins, and comparative resources in harmless counterparts. **Toxicon**, v. 151, p. 137-155, set. 2018.

WATANABE, M. et al. The role of TRPV1 channels in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. **Neuroreport**, v. 26, n. 3, p. 173-178, fev. 2015.

ZANCHET, E. M. et al. Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, proinflammatory cytokines, nitric oxide and prostanoids in pain facilitation induced by *Phoneutria nigriventer* spider venom. **Brain Research**, v. 1021, n. 1, p. 101-111, set. 2004.

ZARPELON, A. C. et al. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 1, p. 90-101, maio 2013.

ZHANG, J. J. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits nuclear factor-kB pathway activation, and regulates adhesion, migration, invasion and apoptosis of endometriotic stromal cells. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 17, n. 3, p. 175-181, mar. 2011.

ZHANG, Y. X. et al. Ginsenoside-Rd exhibits anti-inflammatory activities through elevation of antioxidant enzyme activities and inhibition of JNK and ERK activation in vivo. **International Pharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1094-1100, dez. 2013.

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

ZOCCAL, K.F. et al. Opposing Roles of LTB4 and PGE2 in Regulating the Inflammasome-dependent Scorpion Venom-induced Mortality. **Nature Communications**, v. 7, p.1-13, fev. 2016.

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

Pharmacological modulation of *Rhopalurus rochai* venom-induced hyperalgesia and inflammation in mouse paw

Eduardo C. Battocchio, Camila R. Ferraz, Julia Bagatim-Souza, Irene Knysak, Denise M. Cândido, Waldiceu A. Verri Jr, Fábio H. Kwasniewski

Key-words: pain, edema, cytokines, leukocytes, scorpion venom, *Rhopalurus rochai*.

Abstract

Scorpions of the Buthidae family trigger important pathophysiological events in their victims. *Rhopalurus rochai* is a buthid scorpion of the Brazilian scorpiofauna with very scarce information about the effect of its venom. Here we studied the effects of the *R. rochai* venom (Rrv) in the mouse paw, evaluating mechanical hyperalgesia, edema and neutrophil migration, as well as the pretreatment with pharmacological agents intended to investigate the involvement of NF- κ B (PDTC and dexamethasone), TNF- α (etanercept), cyclooxygenase-derived mediators (indomethacin and celecoxib) and histamine (pyrilamine) in the pathophysiological mentioned events. Male and female Swiss mice (20 to 25g) were envenomed with Rrv injected i.pl. (20 microl, 0.2, 0.6, 1.2 and 2.4 microg/paw) and mechanical hyperalgesia was analysed using the von Frey method after 0.5, 1 and 3h. The dose of 2.4 microg/paw was used in the subsequent experiments to measure edema using a thickness gauge, TNF- α and IL-1b levels by the ELISA method and myeloperoxidase activity (MPO, measured at 3h) used as an indicator of neutrophil recruitment. Except by the lowest dose, only effective at 0.5h, Rrv induced mechanical hyperalgesia at all times. Edema and TNF- α production occurred at all times after envenomation, whereas IL-1b was only increased in the third hour when neutrophil migration was also present. Pretreatment of envenomation with PDTC, dexamethasone or etanercept, decreased mechanical hyperalgesia and edema at all times; similar effect was achieved with the cyclooxygenase inhibitors, excepting the lack of activity of celecoxib in the edema in the third hour. MPO activity was inhibited by PDCT, dexamethasone and celecoxib, but no effect was detectable with the use of etanercept or indomethacin. Pylamine was the less effective agent diminishing mechanical hyperalgesia and edema only in 3 and 0.5h respectively, without effect on MPO activity. In conclusion, these are the first experimental data demonstrating that Rrv is able to induce important local effects culminating in, more than edema as previously showed, mechanical hyperalgesia, inflammatory cytokines production and neutrophil infiltration. Moreover, these pathophysiological effects are prone to be inhibited with drugs affecting the production or activity of inflammatory mediators, highlighting different possibilities of intervention in the local effects of the scorpion venom.

Introduction

Scorpions are well adapted to different biomes, consequently, the encounter with humans can be frequent. As result of this encounter, a large number of accidents, sometimes resulting in fatal outcome, are observed. In accordance to this situation, scorpion sting is a public health problem in several countries of different continents with a population at risk estimated around 2 billion of people. Of the 18 families in which scorpions are distributed, the most dangerous is the Buthidae, with their scorpions inflicting the accidents with medical importance (Chippaux & Goyffon, 2008). In a consensual classification of the accidents, following clinical manifestations it was divided into 3 classes. Class I when only local abnormalities were present (pain, swelling, paresthesia, erythema, etc.); class II to systemic without life threatening manifestations (nausea, vomiting, general paresthesia, hypertension, tachycardia, sweating, salivation, lacrimation, diarrhea, abdominal distention, mental confusion, pancreatitis, etc.) and class III, to systemic life threatening manifestations (cardiovascular collapse, hypotension, dyspnea, pulmonary edema and neurological failure) (Khattabi et al., 2011).

In all Brazilian biomes scorpions belonging to the Buthidae family are found; *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello 1922) are the main ones responsible for the majority of accidents classified as class II or III. For this reason, most studies published by Brazilian research groups were performed experimentally with their venom or describe important physiological changes found in their victims. Many of these studies show the onset of inflammatory reaction involved in pathophysiological changes in rodents, as paw pain and swelling (Nascimento et al 2005; Pessini et al 2008) and pulmonary edema (Freire-Maia and Matos 1993; Coelho et al, 2007; Zoccal et al 2016; Miyamoto et al 2018). In fact, there is a consensus involving the participation of inflammatory cells and chemical mediators (prostanoids, leukotrienes, IL-6, TNF- α and IL-1 β) in experimental models of envenomation as well as in clinical studies involving different scorpions around the world (reviewed by Reis et al, 2019).

Another genus included in Buthidae family, but with scarce information about their involvement in accidents and alterations triggered by its venom is *Rhopalurus* (Thorell, 1876). Their species are found in countries of Central and South America (Fet and Lowe, 2000); in Brazil, probably due to the fact that they are found in Cerrado and Caatinga, biomes with less populated areas, epidemiological and clinical data are rare. In two case reports enrolling people stung by *R. agamemnon* (C. L. Koch, 1839), one described absence of pain (something unusual in scorpion sting) but presence of local paresthesia that later spread to the whole body (Brandão et al, 2010). In the other study with two patients, in which the animal's identity is probably *R. agamemnon*, it was reported intense local pain and signs of systemic perturbation as blurring vision, tachycardia, lacrimation, agitation, sialorrhea, somnolence and muscular spasms (Carvalho et al, 2007). It is important to note that these systemic signs and symptoms may include the cases in the class II clinical manifestations. There is only one report about a patient stung by *R. rochai* (Borelli, 1910) who developed severe complications and died before reach the hospital, probably to anaphylaxis (Melo et al, 2019).

Experimental data with mice show that *R. agamemnon* venom injected intraperitoneally is practically nontoxic (Nishikawa et al 1994), whereas *R. rochai*, although less

potent than *T. serrulatus* and *T. bahiensis* venom, induced paw edema after the subcutaneous injection (Severino et al., 2009). Since the paucity of experimental and clinical results investigating the action of *Rhopalurus* venom, this study was designed to investigate the local changes in mouse paw induced by intraplantar injection of *R. rochai* venom. With this purpose, we first analyzed the mechanical hyperalgesia, edema, cytokine production and leukocyte migration followed by experiments aiming to verify pharmacologically different classes of mediators frequently involved in the inflammatory reaction. We found that Rrv is able to induce the analysed features and that the activation of nuclear transcription and the production of inflammatory mediators may have an important role in the local abnormalities evidenced in our study.

Material and methods

Animals

The experiments were performed on pathogen-free Swiss mice (20 - 25 g) from Londrina State University, Londrina, PR, Brazil. Males were used in almost all experiments and female used in MPO dosages when pretreatments with drugs were assayed. Experiments done to assess the participation of histamine were carried out only with females. The animals were housed in standard plastic cages with water and food ad libitum, in a room with temperature of around 23°C and 12/12 h light/dark cycle. Animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and approved by the Ethics Committee of the Londrina State University (CEUA nº 21366.2015.72 and nº 014.2020).

Rhopalurus rochai venom and envenomation

Rhopalurus rochai lyophilized crude venom (Rrv) was supplied by Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil) and kept at -20°C until its use. Rrv was diluted in isotonic sterile saline and injected by intraplantar route in fixed volume of 20 microl/paw. Initially three different doses was used based on the literature (Severino et al., 2009), 0.2, 0.6 and 2.4 microg/paw. The control group consisted of animals that received only isotonic sterile saline (20 microl/paw).

Drugs and protocols of treatments

Etanercept (10 mg/kg ip, 48 and 1 hour before Rrv) obtained from Wyeth Indústria Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brazil); pyrrolidine dithiocarbamate ammonium salt - PDTC (100 mg/kg, 100 microl sc, 1 hour before Rrv) obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); Dexamethasone (2mg/kg sc, 1 hour before Rrv) obtained from Laboratório Teuto Brasileiro (São Paulo, Brazil); Indomethacin (5mg/kg ip, 40 minutes before Rrv) obtained from Aspen Pharma Brazil (Rio de Janeiro, Brazil); Celecoxib (30 mg/kg, ip., 1 hour before Rrv)

obtained from Pharmacia–Pfizer (São Paulo, Brazil); Pyrilamine (6 mg/kg ip., 30 minutes before Rrv) obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Pyrilamine and dexamethasone were dissolved in isotonic sterile saline, PDTC was dissolved in 2% DMSO in saline and Indomethacin in TRIS.

Mechanical hyperalgesia test

Mechanical hyperalgesia was tested in mice by the electronic von Frey anesthesiometer: Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil adapted with a 0.5 mm² contact area polypropylene tip as previously reported (Vivancos et al., 2004). The results are expressed by delta (Δ) withdrawal threshold (in grams), which was calculated by subtracting the zero-time mean measurements from the mean measurements after stimulus at the indicated time points.

Paw edema

The paw volume was measured with a gauge (10 mm Mitutoyo 7301, Suzano, SP, Brazil) before (baseline) and after the injection of Rrv or NaCl 0.9% in the selected times (0.5, 1 and 3h). Two measurements (in mm/paw) were done in baseline and at each point time and the mean was used to determine the delta (Δ) value, subtracting the baseline value from that obtained at each time point (Maioli et al, 2015).

Myeloperoxidase (MPO) activity assay

Myeloperoxidase was performed as indirect measure of neutrophil presence in the tissue. Paw skin samples were collected 3 h after *R. rochai* venom injection and homogenized. Supernatants were used for the myeloperoxidase activity assay was performed as previously described (Bradley et al., 1982; Borghi et al., 2016).

Cytokine measurement

Paw skin samples were collected 0.5, 1 and 3 h after the injection of *R. rochai* venom and homogenized. The IL-1 β and TNF- α levels were measured in the supernatants using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions (eBioscience®, Ready-SET-Go) as previously reported by Ferraz et al. (2015).

Paw tissue histology

Paw skin sample obtained 3 hour after *R. rochai* envenomation was paraffin-embedded and processed for hematoxylin and eosin staining as previous described by

Lourenco-Gonzalez et al. (2019). The presented images represent sections viewed in an optical microscope (10x).

Statistical analysis

Results are presented as means \pm SEM of measurements made on 6 mice in each group per experiment, representative of 2 independent experiments. Two-way repeated measure analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post hoc test was used when responses were measured at different times points after the stimulus injection. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test was performed to compare the values at the indicated time points. Statistical differences were significant when $P < 0.05$ in the software Prism 6.0.

Results

Rrv induced inflammation in mouse paw

We first evaluated mechanical hyperalgesia in 0.5, 1 and 3 hours after the injection of Rrv (0.2, 0.6, 1.2 and 2.4 mg/paw). All doses of Rrv induced hypernociceptive response but, excepting the smaller dose, effective only at 30 minutes, the effect induced with 0.6, 1.2 and 2.4 mg/paw was observed throughout the evaluated time (Figure 1A). Since only the results obtained with 2.4 microg/paw were different at all time points when compared to 0.2 microg/paw, this dose was used in subsequent experiments. Paw edema was also observed at all analyzed times after Rrv injection, with a decreasing pattern over time (Figure 1B). Rrv also induced the production of IL-1b and TNF-a, with the first being detected only in the third hour while the second at all times (Figure 1, C and D). The activity of MPO, used as a marker of neutrophils in the tissue, was increased in the third hour after Rrv injection (Figure 1, E). The neutrophil infiltration in the third hour was confirmed with the histology of the paw (Figure 1, F – isotonic saline injection – and G – Rrv injection. Observe the area in the rectangle with cell nuclei).

Rrv induced inflammation is negatively modulated by Dexamethasone and PDTC

Considering that IL-1b and TNF-a were produced in the envenomed paws, we set out experiments to explore the effect of steroidal anti-inflammatory dexamethasone and an inhibitor of NF-kB activity, PDTC, on the effects induced by Rrv. Both dexamethasone and PDTC inhibited mechanical hyperalgesia at all analyzed times, edema and neutrophil infiltration induced by Rrv (Figures 2A, 2B and 2C).

Blocking TNF-a partially inhibits the inflammation induced by Rrv

Since NF- κ B activation seems to be involved in pathophysiological state induced by Rrv, and there was TNF- α production at all time points analyzed in our experiment, the animals were pretreated with TNF- α blocker, etanercept. Etanercept pre-treatment resulted in decreased mechanical hypernociception and edema at all times, but no changes in MPO activity was found (Figures 3A, 3B and 3C).

Cyclooxygenase inhibitors decreases inflammation induced by Rrv

Cyclooxygenase inhibitors are widely used to alleviate pain, since we initially showed that Rrv triggered mechanical hyperalgesia, envenomed animals were pre-treated with indomethacin or celecoxib (both cyclooxygenase inhibitors). Both similarly reduced mechanical hypernociception induced by Rrv at all times (Figure 3A), but the values were still above the control group (saline 0.9%). Except for the lack of activity of celecoxib at 30 minutes, edema was completely inhibited by both cyclooxygenase inhibitors (Figures 4A and 4B). The presence of neutrophil in the paw tissue was reduced to similar values to control group when celecoxib was used whereas indomethacin did not have effect (Figure 4C).

H1 histamine receptor is partially involved in Rrv induced inflammation

To evaluate the participation of histamine H1 receptors in the inflammatory reaction induced by Rrv, the animals were pre-treated with pyrilamine (a H1 inverse agonist). Mechanical hyperalgesia was negatively affected by pyrilamine only in the third hour of envenomation (Figure 5A); in contrast, in edema induced by Rrv the inhibitory effect of pyrilamine was noted only at 30 minutes (Figure 5B). On the other hand, no effect of pyrilamine was observed on neutrophil migration (Figure 5C).

Discussion

Our results clearly show that *Rhopalurus rochai* venom triggers local production of inflammatory cytokines and the resulting local inflammation (edema and leukocyte influx) and hyperalgesia can be modulated by anti-inflammatory drugs. There is only one study about biological effect of Rrv published by Severino et al (2009) showing edema in mouse paw, but no attention was paid to other inflammatory signs as well as the production of mediators or pharmacological modulation.

Since pain is the most reported symptom after scorpion sting, we studied mechanical hyperalgesia after the injection of three doses of Rrv, with positive results throughout the time of the experiment when 0.6 and 2.4 μ g/paw were used. Pain experimentally induced with scorpion venom was found after the injection of *Buthus martensi* Karsch and *Tityus serrulatus* venoms (Nascimento et al., 2005; Pessini et al., 2008; Niu et al., 2013; Deus et al, 2016). Concerning *Rhopalurus* venom, there is no experimental data in this sense, but it was

reported intense pain in two victims of *R. agamemnon* (Carvalho et al., 2007) and one of *R. amazonicus* (Fuentes-Silva et al., 2014) in which swelling beginning after 30 minutes in the thumb and extending to the arm was also noticed. Despite different methods used, persistent edema throughout the experiment showed here is in accordance with the results published by Severino et al. (2009). Neutrophil migration is an important feature in inflammation induced by classical stimuli as carrageenan and LPS administration in mouse paw (Posadas et al., 2004; Pinho-Ribeiro et al., 2016) and it is found also after scorpion venom injection, as *T. serrulatus* (Zoccal et al., 2013; Miyamoto et al., 2018) and *Androctonus australis hector* (Kabrine and Laraba-Djebari, 2014) in mouse peritoneal cavity or lungs. The neutrophil infiltration into mouse paw showed here is in accordance to these results.

The production of inflammatory cytokines is another feature found in victims of scorpionism (D'Suze et al., 2003; Fukuhara et al., 2003, Jalali et al. 2011) or in experimental models obtained with venom from buthid scorpions (Petricevch and Peña 2002; Pessini et al., 2003; Abdonn and Fatani, 2009; Zoccal et al., 2014, Miyamoto et al., 2018;). Here we found IL-1b and TNF-a after Rrv injection and this production could be related to the hyperalgesia and edema demonstrated here since both cytokines may contribute to both (Goldblum and Sun, 1990; Campbell et al., 1993; Binshtok et al., 2008; Leo et al., 2015). Moreover these cytokines may stimulate the production of several mediators involved in the hyperalgesia and edema (Verri et al., 2007). While inflammatory cytokine production is induced by several scorpion venoms from Buthidae family, the cytokine production stimulated by *Rhopalurus* venom was poorly investigated up to now. Our result is different to that showing the absence of the production of IL-1b, TNF-a and IL-12 in mouse peritoneal cavity challenged with *R. junceus* venom (Yglesias-Rivera and Díaz-Gracia, 2018). However, *R. crassicauda* venom activated IL-6 production by macrophages *in vitro* (Abreu et al., 2020). Taken together, these results with *Rhopalurus* venom argue in favor possibility that the production of the inflammatory cytokine may be stimulated by venom from one *Rhopalurus* specie but not by another. It seems that in our context Rrv induced TNF-a release by resident cells (macrophages and/or mast cells) since this cytokine was observed soon as 30 minutes after venom injection. Although IL-1b seems to be produced as early as TNF-a, in fact their concentration was only elevated in the third hour. It is possible that the early TNF-a production could stimulate incoming neutrophils and in turn these cells could produce some of the found IL-1b causing its increase in the third hour. This action of TNF-a was proposed early by Marucha et al, 1991. In fact, TNF- α induces the production of inflammatory mediators such as IL-1b and PGE2, which in turn, act on nociceptive neurons, triggering hyperalgesia (Verri et al., 2007), and in the recruitment of leukocytes to the inflammatory site (Issekutz et al., 1992).

Some of these properties of TNF-a may be operating in our experiments, since hyperalgesia and edema induced by Rrv were negatively modulated when TNF blocker (etanercept) was used. However, this treatment did not modify the neutrophil infiltration, which is accordance to Cybulski et al. (1988) showing that TNF-a is not involved in LPS-induced leukocyte migration into skin of rabbits. Neutrophil migration is an important feature found in inflammation induced by classical stimuli as carrageenan and LPS

administration in mouse paw (Posadas et al., 2004; Pinho-Ribeiro et al., 2016) or even venom from Bothrops snakes (Wanderley et al., 2014; Felix-da-Silva et al., 2017). The neutrophil infiltration into mouse paw showed here is in accordance to results obtained with scorpion venom from *T. serrulatus* (Zoccal et al., 2013; Miyamoto et al., 2018) and *Androctonus australis hector* (Kabrine and Laraba-Djebari, 2014) in peritoneal cavity or lungs.

There is a vast array of mediators involved in hyperalgesia, edema and neutrophil migration. To produce some of them it is necessary the activation of the transcription factor NF- κ B. One type of such mediators are cytokines as IL-1 β and TNF- α , which were detected in this study. In accordance with this role of NF- κ B we used two drugs that inhibit this factor, dexamethasone and PDTC. Mechanic hyperalgesia was still detectable in mice pretreated with dexamethasone and PDTC, but edema and neutrophil migration were blocked by both drugs. The pro-inflammatory actions of NF- κ B have been extensively studied in several models of inflammation. For instance, in response to diverse pathogen- or danger associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs), leukocytes (neutrophils and macrophages) were rapidly activated and produce cytokines (Wang et al., 2014; Dorrington and Fraser, 2017). In this sense, it is possible that interacting with TLRs, Rrv activated leukocytes and consequently the NF- κ B pathway of mediator production. The interaction between scorpion venom and TLRs was proposed by Zoccal et al. (2014) to *T. serrulatus* (interacting with TLR-2 and TLR-4) and by Khemili et al. (2020) to *Androctonus australis hector* venom (with TLR-4). Despite this possible involvement of NF- κ B through venom TLR activation, Nascimento et al. (2005) did not found dexamethasone effect on edema induced by *T. serrulatus* venom in paw rats.

Prostanoids are involved in inflammation triggered by several compounds and molecules. They are produced by constitutive or inducible enzymes (cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2, respectively) that can be inhibited by classical drugs as indomethacin (non-selective inhibitor) and celecoxib (selective cyclooxygenase-2 inhibitor). Pretreating the animals with these drugs the mechanical hyperalgesia was equally inhibited, whereas edema was reduced by both but only with indomethacin at all analyzed times and neutrophil influx only inhibited by celecoxib. Prostaglandins, especially PGE₂, are classically related to pain (Ferreira et al., 1978; Moriyama et al., 2005; Lin et al., 2006) and their inhibitory effect on pain induced by Rrv was to be expected. Despite that, our results about pain are not totally in agreement with those published early by Pessini et al. (2008) working with *T. serrulatus* venom in rats; these authors found inhibitory effect only with celecoxib but not with indomethacin. Bai et al. (2006) also demonstrated that indomethacin can reduce pain induced by scorpion venom, but using as model *B. martensi* Karsch injected in rat paw. When the effect of cyclooxygenase inhibitors on edema obtained in the current results are compared with those reported by Pessini et al. (2008), again they found an inhibitory effect only with celecoxib. Indomethacin also failed to modulate the edema in rat paw induced by *T. serrulatus* venom (Nascimento et al., 2005). Different venoms as well as differences in the dosages of the drugs and animals used could explain such disagreements. Celecoxib reduced neutrophil infiltration in our experiments.

Finally, we attempt to understand the role of histamine in inflammation induced by Rrv, since this vasoactive amine is stored in mast cells and its secretion is usually very fast, with reported effects on pain, edema and neutrophil migration. Nociceptive behavior triggered by *T. serrulatus* (Nascimento et al., 2005) and *B. martensi* Karch (Liu et al., 2007) was inhibited by histamine H1 antagonists, which is in partial accordance with our results since we measured mechanical hyperalgesia and obtained reduced values only in the last time analyzed (3 hours). In this sense Liu et al (2007) also observed a reduction with the use of pyrilamine and chlorpheniramine, but they analyzed this effect without evaluating times before the fifth hour of envenomation. In line with our results, Nascimento et al. (2005) found inhibitory effect promethazine (H1 antagonist) in rat paw edema induced by *T. serrulatus* venom, with drug effect also observed up to the 1 hour after envenomation.

References

Abdoon N.A., Fatani A.J. 2009. Correlation between blood pressure, cytokines and nitric oxide in conscious rabbits injected with *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. scorpion venom. *Toxicon* 54, 471–480.

Abreu, C.B., Bordon K.C.F., Cerni F.A., Oliveira I.S., Balenzuela C., Silva G.M.A., Zoccal K.F., Reis M.B., Wiezel G.A., Peigneur S., Pinheiro-Júnior E.L., Tytgat J., Cunha T.M., Quinton L., Faccioli L.H., Arantes E.C., Zottich U. 2020. Pioneering study on *Rhopalurus crassicauda* scorpion venom: isolation and characterization of the major toxin and hyaluronidase. *Front. Immunol.* 11: 2011. doi: 10.3389/fimmu.2020.02011

Bai Z-T., Liu T., Chai Z-F., Pang X-Y., Ji Y-H. 2006. Rat pain-related responses induced by experimental scorpion BmK sting. *Eur. J. Pharmacol.* 552: 67–77.

Binshtok A.M., Wang H., Zimmermann K., Amaya F., Vardeh D., Shi L. 2008. Nociceptors are Interleukin-1b sensors. *J. Neurosci.* 28 (52), 14062-14073.

Brandão R.A., Françoso R.D. 2010. Accident caused by *Rhopalurus agamemnon* (Koch, 1839) (Scorpiones, Buthidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43(3): 342-344.

Campbell W.N. Ding X., Goldblum S.E. Interleukin-1 alpha and -beta augment pulmonary artery transendothelial albumin flux in vitro. *Am J Physiol.*, 1992 Jul;263(1 Pt 1): L128-36. doi: 10.1152/ajplung.1992.263.1.L128.

Carvalho L.S., Santos M.P.D., Dias S.C. 2007. Scorpionism in the rural zone of Teresina, State of Piauí: relate of envenomation cases. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40(4): 491.

Chippaux, J.-P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 107, 71e79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.021>.

Coelho, F.M.; Pessini, A.C.; Coelho, A.M.; Pinho, V.S.; Souza, D.G.; Arantes, E.C.; Teixeira, M.M.; Teixeira, A.L. 2007. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 50 (3), 420-427.

Cybulsky M.I., McComb D.J., Movat H.Z. 1988. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. *J Immunol.* 140 (9):3144-9.

Deuis J.R., Wingerd J.S., Winter Z., Durek T., Dekan Z., Sousa S.R., Zimmermann K., Hoffmann T., Weidner C., Nassar M.A., Alewood P.F., Lewis R.J., Vetter I. 2016. Analgesic Effects of GpTx-1, PF-04856264 and CNV1014802 in a mouse model of NaV 1.7-mediated pain. *Toxins (Basel)*, 8 (3) 78. doi: 10.3390/toxins8030078..

Dorrington M.G., Fraser I.D.C. 2019. NF- κ B signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. *Front. Immunol.* 10: 705. doi: 10.3389/fimmu.2019.00705

D'Suze G, Moncada S., González C, Sevcik C., Aguilar V., Alagón A. 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 367–375.

Félix-Silva J., Gomes J.A.S., Xavier-Santos J.B., Passos J.G.R., Silva-Junior A.A., Tambourgi D.V., Fernandes-Pedrosa M.F. 2017. Inhibition of local effects induced by *Bothrops erythromelas* snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. *Toxicon* 125: 74-83. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.11.260

Ferreira, S.H., Nakamura M., Castro M.S.A. 1978. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins*, 16 (1), 31-37. doi: 10.1016/0090-6980(78)90199-5

Fet, V.W. and Lowe, G. Family BUTHIDAE C. L. Koch, 1837. In: *Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998)*, eds. Fet, V.W., Sissom, D., Lowe, G., Braunwalder, M.E. New York Entomological Society, 2000.

Freire-Maia, L.; Matos, I.M. 1993. Heparin or a PAF antagonist (BN 52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Toxicon* 31 (9), 1207-1210.

Fuentes-Silva D., Santos-Jr A.P., Oliveira J.S. 2014. Envenomation caused by *Rhopalurus amazonicus* Lourenco, 1986 (Scorpiones, Buthidae) in Para State, Brazil. *J. Venomous Animals Toxins including Trop. Dis.* 20, 52. doi:10.1186/1678-9199-20-52

Fukuhara Y.D.M., Reis M.L., Dellalibera-Joviliano R., Cunha F.Q.C., Donadi E.A. 2003. Increased plasma levels of IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-a in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 49–55.

Goldblum S.E., Sun W.L. 1990. Tumor necrosis factor-alpha augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro. *Am J Physiol.*, 258 (2 Pt 1):L57-67. doi: 10.1152/ajplung.1990.258.2.L57.

Isekutz, A.C., Lopes, N., Isekutz, T.B. Role of interleukin-1 and tumour necrosis factor in leukocyte recruitment to acute dermal inflammation. *Mediators Inflamm.* 1, 347-353, 1992.

Jalali A., Pipelzadeh M.H., Taraz M., Khodadadi A., Makvandi M., Rowan E.G. 2011. Serum TNF- α levels reflect the clinical severity of envenomation following a *Hemiscorpius lepturus* sting. *Eur. Cytokine Netw.* 22 (1), 5-10.

Kabrine, M.; Laraba-Djebari, F. 2014. Immunomodulatory and protective properties of tacrolimus in experimental scorpion envenomation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27 (1), 69-78.

Khattabi A., Soulaymani-Bencheikh R., Achour S., Salmi L.R. 2011. Classification of clinical consequences of scorpion stings: consensus development. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(7):364-9. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.03.007.

Khemili D., Laraba-Djebari F., Hammoudi-Triki D. 2020. Involvement of toll-like receptor 4 in neutrophil-mediated inflammation, oxidative stress and tissue damage induced by scorpion venom. *Inflammation* 43 (1). DOI: 10.1007/s10753-019-01105-y

Leo M., Argalski S., Schäfers M., Hagenacker T. 2015. Modulation of voltage-gated sodium channels by activation of tumor necrosis factor receptor-1 and receptor-2 in small DRG neurons of rats. *Mediators Inflamm.* 2015, doi: 10.1155/2015/124942

Lin, C. R., Amaya F., Barrett L., Wang H., Takada J., Samad T.A., Woolf C.J. 2006. Prostaglandin E2 Receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 (3), 1096-1103. doi:10.1124/jpet.106.105569

Liu T., Bai Z-T., Pang X-Y., Chai Z-F., Jiang F., Ji Y-H. 2007. Degranulation of mast cells and histamine release involved in rat pain-related behaviors and edema induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. *Eur. J. Pharmacol.* 575: 46–56.

Maioli N.A., Zarpelon A.C., Mizokami S.S, Calixto-Campos C., Guazelli C.F.S., Hohmann M.S.N., Pinho-Ribeiro F.A., Carvalho T.T., Manchope M.F., Ferraz C.R., Casagrande R., Verri Jr W.A. 2015 The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 48 (4): 321-31. doi: 10.1590/1414-431X20144187

Marucha P.T., Zeff R.A., Kreutzer, D.L. 1991. Cytokine-induced IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte: transcriptional and post-transcriptional regulation by tumor necrosis factor and IL-1. *J Immunol.* 147 (8): 2603-8.

Melo I.M.L.A., Ramalho R.D., Bezerra M.M.V., Oliveira-Filho I.E., Medeiros C.R., Gadelha M.A.C., Pardal P.P.O. 2019. Fatal anaphylaxis to *Jaguajir rochae* (Borelli, 1910) (Scorpiones, Buthidae) in Brazil: a case report. *Rev. Patol. Trop.* 48 (3): 187-194. doi: 10.5216/rpt.v48i3.60349

Miyamoto J.G., Andrade F.B., Ferraz C.R., Cândido D.M., Knysak I., Venancio E.J., Verri Jr. W.A., Landgraf M.A., Landgraf R.G., Kwasniewski F.H. 2018. A comparative study of pathophysiological alterations in scorpionism induced by *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venoms. *Toxicon* 141, 25-33.

Moriyama T., Higashi T., Togashi K., Iida T., Segi E., Sugimoto Y., Tominaga T., Narumiya S., Tominaga M. 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol. Pain* 1 (3). doi:10.1186/1744-8069-1-3

Nascimento JR, E.B.; Costa, K.A.; Bertollo, C.M.; Oliveira, A.C.P.; Rocha, L.T.S.; Souza, A.L.S.; Glória, M.B.A.; Moraes-santos, T.; Coelho, M.M. 2005. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 45 (5), 585-593.

Nishikawa A.K., Caricati C.P., Lima M.L., Santos M.C., Kipnis T.L., Eickstedt V.R., Knysak I., Silva M.H., Higashi H.G., Silva W.D. 1994. Antigenic cross-reactivity among the venoms from several species of Brazilian scorpions. *Toxicon* 32, 989-998.

Niu Q-S, Jiang F., Hua L-M., Fu J., Jiao Y-L., Ji Y-H., Ding G. 2013. Microglial activation of p38 contributes to scorpion envenomation-induced hyperalgesia. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 440 (3), 374-380.

Pessini A.C., Souza A.M., Faccioli L.H., Gregório Z.M.O., Arantes E.C. 2003. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TstX-I in mice. *International Immunopharmacology* 3, 765-774.

Pessini, A.C.; Kanashiro, A.; Malvar, D.C.; Machado, R.R.; Soares, D.M.; Figueiredo, M.J.; Kalapothakis, E.; Souza, G.E.P. 2008. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. *Toxicon* 52 (7), 729-736.

Petricевич V.L., Peña C.F. 2002. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators Inflamm.* 11 (3), 173-180.

Pinho-Ribeiro F.A., Zarpelon A.C., Mizokami S.S., Borghi S.M., Bordignon J., Silva R.L., Cunha T.M., Alves-Filho J.C., Cunha F.Q., Casagrande R., Verri Jr, W.A. 2016. The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation. *J. Nutr Biochem.* 33: 8-14. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.03.013

Posadas I., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L., Cirino G. 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.* 142 (2): 331-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0705650

Reis M.B., Zoccal K.F., Gardinassi L.G., Faccioli L.H. 2019. Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects. *Toxicon* 167: 174-179.

Severino D.N., Pereira R.L., Knysak I., Cândido D.M., Kwasniewski F.H., 2009. Edematogenic activity of scorpion venoms from the Buthidae family and the role of platelet-activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms. *Inflammation* 32, 57-64. doi.org/10.1007/s10753-008

Verri Jr. W.A., Cunha T.M., Poole S., Ferreira S.H., Cunha F.Q. 2007. Cytokine inhibitors and pain control. *Rev. Bras. Reumatol.* 47 (5): 341-353.

Yglesias-Rivera A., Díaz-García A. 2018. Effect of *Rhopalurus junceus* scorpion venom on inflammation-related cytokines in healthy BALB/C mice. *e. Ann. Microbiol. Immunol.* 1(2): 1007.

Wanderley C.W.S, Silva C.M.S., Wong D.V.T., Ximenes R.M., Morelo D.F.C., Cosker F., Fernandes C., Palheta-Júnior R.C., Havt A., Brito G.A.C., Cunha F.Q., Ribeiro R.A., Lima-Júnior R.C.P. 2014. Bothrops jararacussu snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. *Toxicon* 90: 134-47.

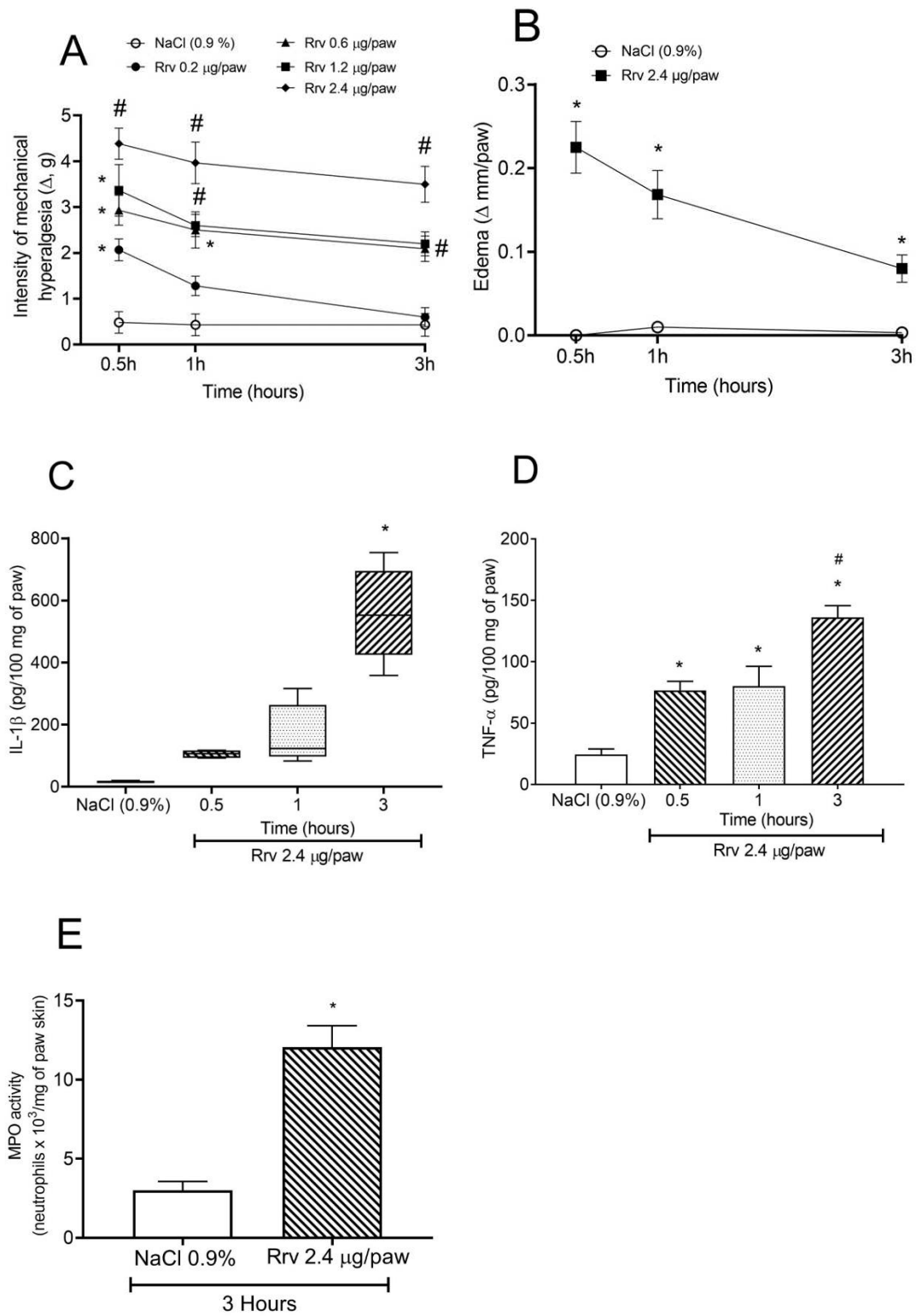
Wang, N., Liang, H., Zen, K. 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front. Immunol.* 2014; 5: 614. doi: 10.3389/fimmu.2014.00614

Zoccal, K.F. Bitencourt C.S., Sorgi C.A., Bordon K.C.F., Sampaio S.V., Arantes E.C., Faccioli L.H. 2013. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. *Toxicon* 61, 1-10.

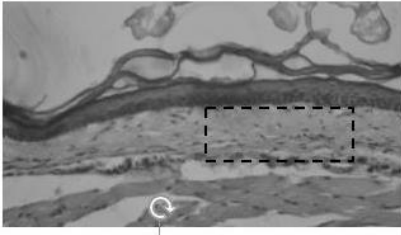
Zoccal K.F., Bitencourt C.S., Paula-Silva F.W.G, Sorgi C.A., Bordon K.C.F., Arantes E.C., Faccioli L.H. 2014. TLR2, TLR4 and CD14 Recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. *PLoS ONE* 9(2): e88174. doi:10.1371/journal.pone.0088174

Zoccal K.F., Sorgi C.A., Hori J.I., Paula-Silva F.W.G., Arantes E.C., Serezani C.H., Zamboni D.S., Faccioli L.H. 2016. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. *Nature Communications* 7:10760. DOI: 10.1038/ncomms10760

Figure 1



F



G

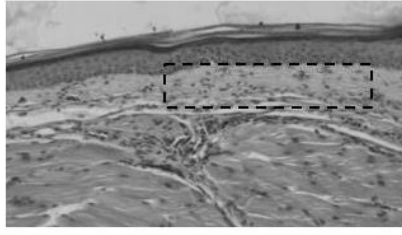


Figure 2

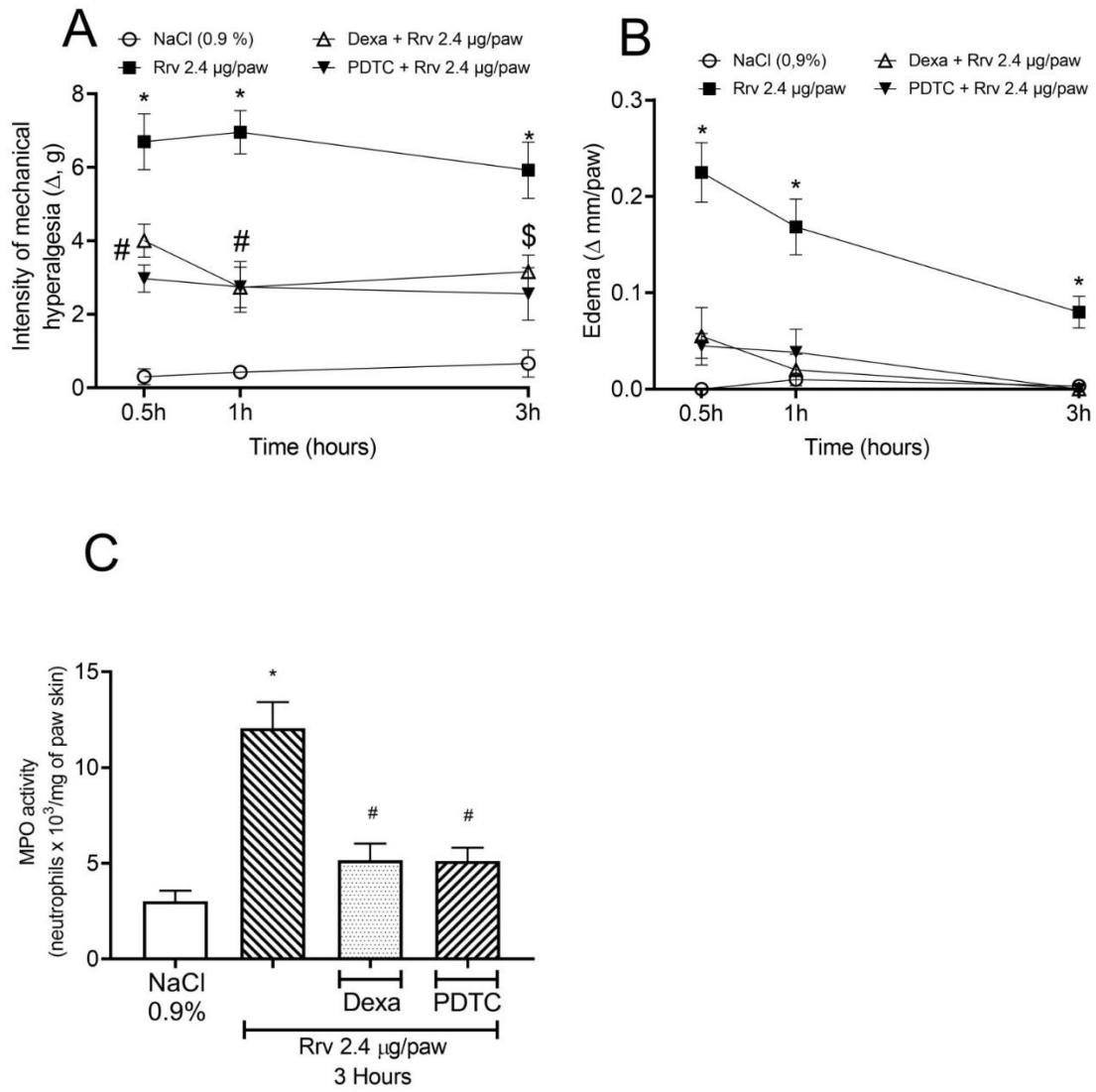


Figure 3

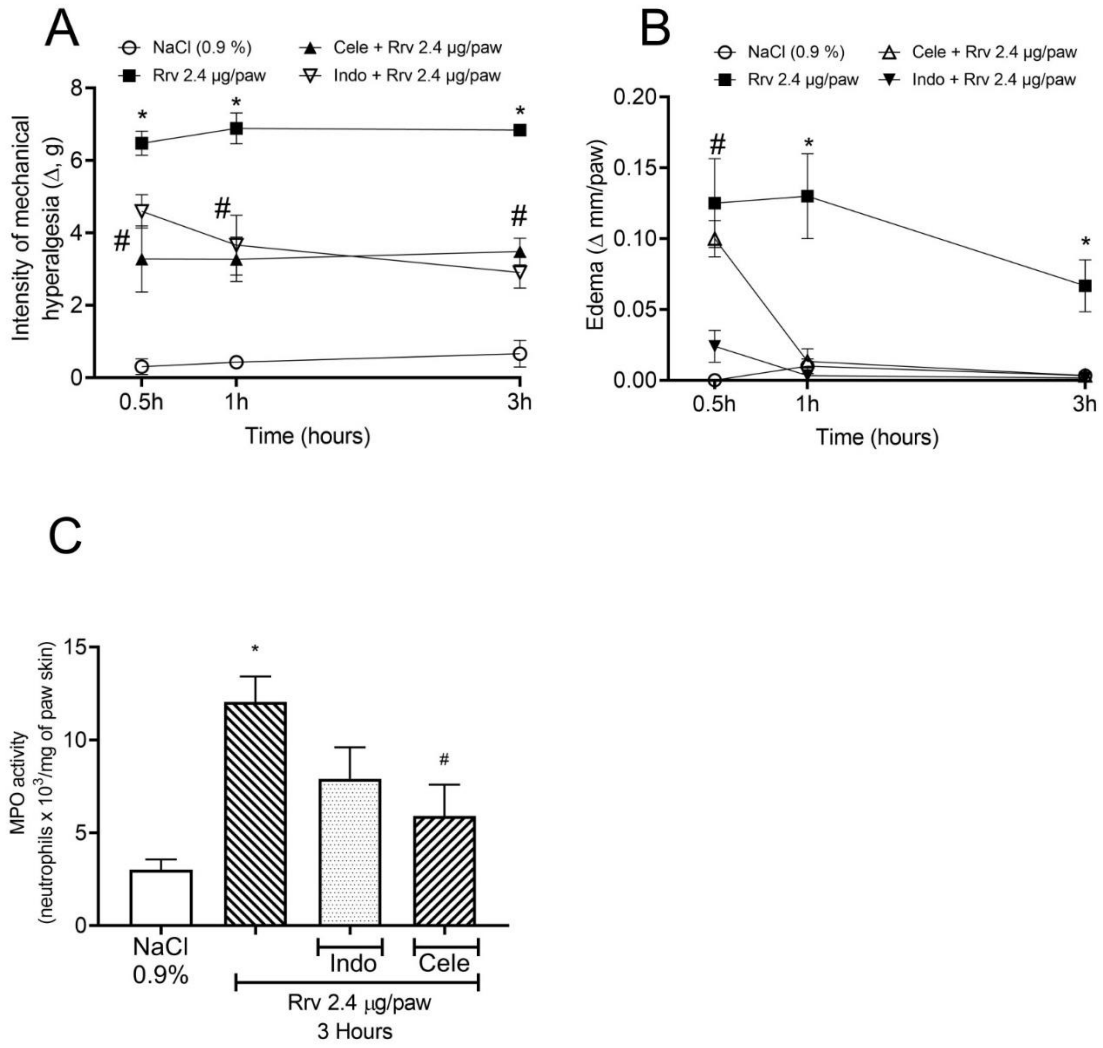


Figure 4

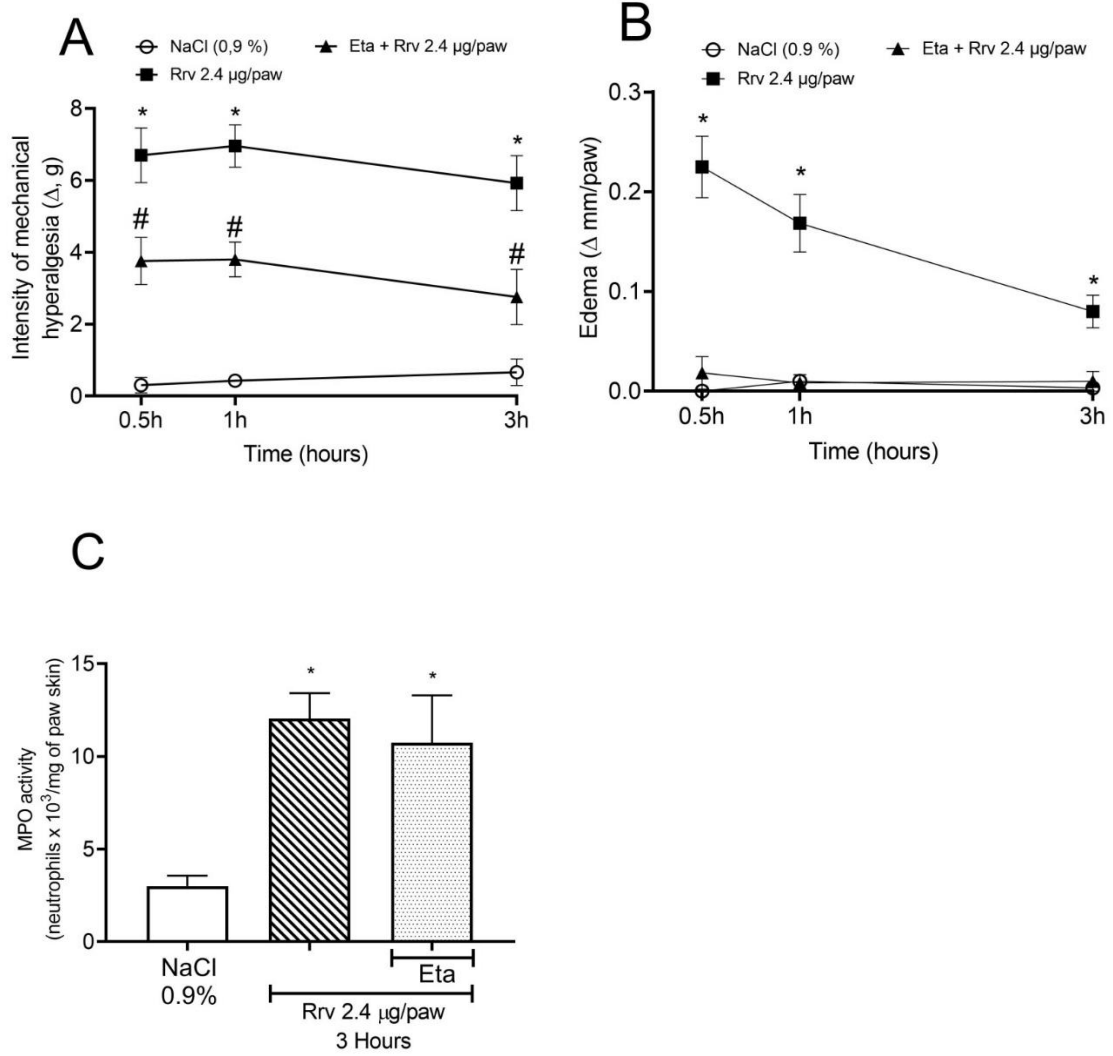
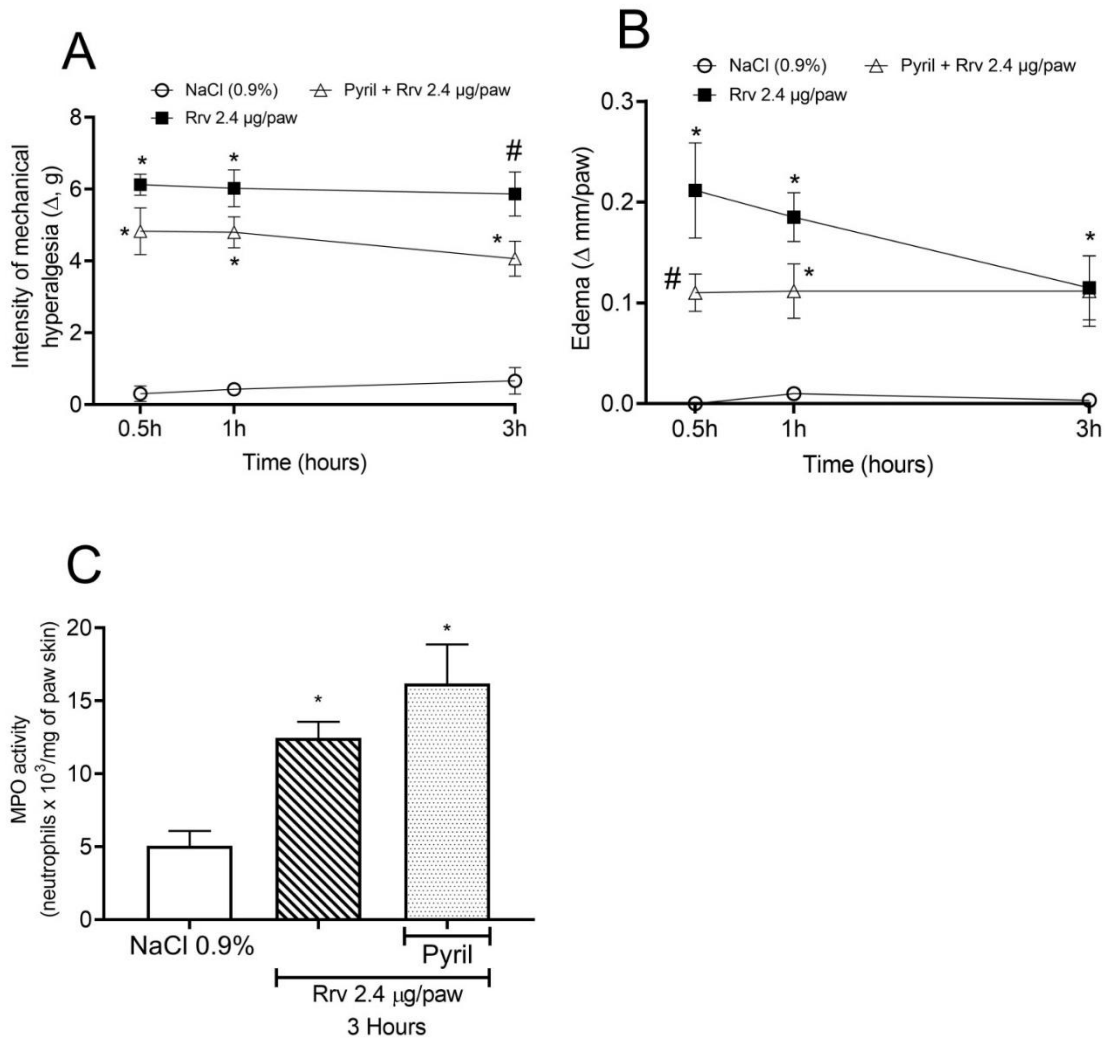


Figure 5



Legends to the figures

Figure 1 - Pathophysiological effects of Rrv. In A, mechanical hyperalgesia of groups stimulated with dosages of 0.2 microg/paw, 0.6 microg/paw, 1.2 microg/paw or 2.4 microg/paw. *p < 0.05 compared to the saline group (0.9%). §p < 0.05 compared to saline (0.9%) and 0.2 microg/paw groups. #p < 0.05 compared to saline (0.9%), 0.2 microg/paw and 0.6 microg/paw groups. In B, paw edema stimulated with Rrv 2.4 µg/paw. *p < 0.05 compared to the 0.9% saline group. In C, IL-1b measurement in plantar tissue. *p < 0.05 compared to other groups. In D, TNF-a measurement in plantar tissue. *p < 0.05 compared to the saline group (0.9%). #p < 0.05 compared to groups evaluated 0.5 and 1h after Rrv stimulus. In E, MPO activity in plantar tissue 3 hours after Rrv stimulus. *p < 0.05 compared to the saline group (0.9%). 6 animals per group. In F, histology from the saline group (0.9%) and in G, histology from the Rrv 2.4 g/paw group, after 3 hours. Data were expressed as means ± SEM.

Figure 2 - Effects of NF-kB inhibitor pretreatments on Rrv-induced pathophysiological parameters. Groups treated with dexamethasone (2 mg/kg s.c. 1h before) and PDTC (100 mg/kg s.c. 1h before). In A, mechanical hyperalgesia. *p < 0.05 compared to saline (0.9%), dexamethasone and PDTC groups. #p < 0.05 Dexamethasone and PDTC groups compared to 0.9% saline group. §p < 0.05 Dexamethasone group compared to saline group (0.9%). In B, edema in the stimulated paw. *p < 0.05 compared to saline (0.9%), Dexamethasone and PDTC groups. #p < 0.05 PDTC group compared to saline group (0.9%). In C, MPO activity in plantar tissue 3 hours after Rrv stimulus. * p < 0.05 compared to saline (0.9%), Dexamethasone and PDTC groups. # p < 0.05 compared to Rrv group. 6 male animals per group in A and B, and 6 female animals per group in C. Data were expressed as means ± SEM.

Figure 3 - Effects of pretreatment with TNF-a blocker on pathophysiological parameters induced by Rrv. Groups treated with Etanercept (10mg/kg i.p. 48h and 1h before). In A, mechanical hyperalgesia. *p < 0.05 compared to saline (0.9%) and etanercept groups. #p < 0.05 compared to the saline group (0.9%). In B, edema in the stimulated paw. *p < 0.05 compared to Saline (0.9%) and Etanercept groups. In C, MPO activity in plantar tissue 3 hours after Rrv stimulus. * p < 0.05 compared to the saline group (0.9%). 6 male animals per group in A and B, and 6 female animals per group in C. Data were expressed as means ± SEM.

Figure 4 - Effects of COX inhibitor pretreatments on Rrv-induced pathophysiological parameters. Groups treated with celecoxib (30mg/kg i.p. 30 minutes before) and indomethacin (5mg/kg i.p. 1h before). In A, mechanical hyperalgesia. *p < 0.05 compared to saline (0.9%), Celecoxib and Indomethacin groups. #p < 0.05 compared to the saline group (0.9%). §p < 0.05 Celecoxib and Indomethacin groups compared to saline (0.9%). In B, edema in the stimulated paw. *p < 0.05 compared to saline (0.9%), Celecoxib and Indomethacin groups. #p < 0.05 pRr 2.4 g/paw and Celecoxib groups compared to Saline (0.9%) and Indomethacin groups. In C,

MPO activity in plantar tissue 3 hours after Rrv stimulus. * $p < 0.05$ compared to saline (0.9%) and celecoxib groups. # $p < 0.05$ compared to Rrv group. 6 male animals per group in A and B, and 6 female animals per group in C. Data were expressed as means \pm SEM.

Figure 5 - Effects of H1 receptor inverse agonist pretreatment on Rrv-induced pathophysiological parameters. Groups treated with pyrilamine (6mg/kg i.p. 30 minutes before). In A, mechanical hyperalgesia. * $p < 0.05$ Rrv 2.4 μ g/paw and Pyrilamine groups compared to saline group (0.9%). # $p < 0.05$ compared to saline (0.9%) and Pyrilamine group. In B, edema in the stimulated paw. * $p < 0.05$ compared to the saline group (0.9%). # $p < 0.05$ compared to the Rrv 2.4 μ g/paw group. In C, MPO activity in plantar tissue 3 hours after Rrv stimulation. * $p < 0.05$ compared to saline (0.9%) and Pyrilamine groups. # $p < 0.05$ compared to pRr group. 6 female animals per group. Data were expressed as means \pm SEM.