

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KELLY PORTELA SOUSA

**EFEITO *in vitro* DO VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus* NA INDUÇÃO
DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA O PERFIL M1**

São Luís – MA

2017

KELLY PORTELA SOUSA

**EFEITO *in vitro* DO VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus* NA INDUÇÃO DA
POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA O PERFIL M1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira
Coorientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

São Luís – MA

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

SOUSA, KELLY PORTELA.

O EFEITO *in vitro* DO VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus* NA INDUÇÃO DA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA O PERFIL M1 / KELLY PORTELA SOUSA. - 2017.

80 p.

Coorientador(a): FLÁVIA RAQUEL FERNANDES DO NASCIMENTO.

Orientador(a): PAULO VITOR SOEIRO PEREIRA.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUIS-MA, 2017.

1. Atividade Microbicida. 2. Citocinas. 3. E. coli. 4. Fagocitose. 5. Modulação. I. NASCIMENTO, FLÁVIA RAQUEL FERNANDES DO. II. PEREIRA, PAULO VITOR SOEIRO. III. Título.

KELLY PORTELA SOUSA

**EFEITO *in vitro* DO VENENO DO ESCORPIÃO *Tityus serrulatus* NA INDUÇÃO DA
POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS PARA O PERFIL M1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador (Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis)
Universidade Federal do Maranhão

2º Examinador (Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva)
Universidade Federal do Maranhão

3º Examinador (Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos)
Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho à minha família, meu maior alicerce, por ter com ela a maior expressão de amor que já pude sentir em toda minha vida; pelo simples fato de sempre estarmos unidos, cuidando e apoiando um ao outro, independente dos momentos de alegria ou tristeza, sempre mantendo uma relação de muito carinho, ternura e afeto.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida; por ter permitido a realização deste trabalho, me dando força e sabedoria para ultrapassar todos os obstáculos encontrados durante os dois anos de desenvolvimento desta dissertação.

À minha família que esteve sempre ao meu lado, sempre apoiando minhas lutas e aplaudindo minhas conquistas, sendo meu maior incentivo em vencer na vida pessoal e profissional. Amo vocês!

À minha mãe Fátima Portela, por toda atenção e dedicação para minha educação, sempre compreendendo meus momentos mais difíceis trazendo palavras de carinho e esperança. Sempre me mantendo em todas as suas orações para que eu tivesse sucesso em tudo que eu escolhesse seguir em minha vida. Eu te agradeço, mãe! Você é essencial em minha vida!

Ao meu pai Aguinaldo Sousa, meu maior incentivador a nunca desistir de estudar, pela ajuda incondicional durante todos os dias da minha vida, por toda dedicação a minha educação, pelo carinho e compreensão. Obrigada por sempre estar presente em minha vida!

Ao meu irmão, Kevin Portela, por ser a pessoa mais carinhosa que conheço. É tanto carinho que chega a “transbordar”. Mas o que seria de mim sem você? Sinto que estamos envoldidos numa sintonia que vai além dos laços de sangue, e se eu pudesse viver 100 vidas, em todas eu queria ser sua irmã.

À professora Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, pessoa a qual sempre ouvia falar com muito carinho, assim eu tive a oportunidade de conhece-la e ver o quanto és uma profissional admirável e talentosa. Agradeço-te por ter acreditado em mim para a realização deste trabalho, mesmo eu não tendo as melhores experiências acadêmicas para o trabalho a mim designado. Agradeço-te por ter me aceitado como aluna no Laboratório de Imunofisiologia.

Ao meu Orientador, Professor Paulo Vitor Soeiro Pereira, pessoa a qual tomei como referência por ser um excelente profissional comprometido com o que se propõe a fazer, nunca esquecendo do bem maior, a família, e dos amigos. És um grande

exemplo para mim e eu serei eternamente grata por toda paciência e dedicação que tiveste para transmitir os conhecimentos desde a teoria às práticas laboratoriais, por apresentar-se sempre calmo quando tudo parecia estar indo muito mal, pelo entusiasmo nas discussões de resultados, pelas críticas e sugestões que sempre ajudaram no desenvolvimento deste trabalho e também para o meu crescimento profissional. Obrigada professor!

Aos meus mestres que, sempre incentivaram e ajudaram nesta longa caminhada, dando apoio e trazendo os melhores ensinamentos.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF), ambiente que nos oferece condições ideais para o desenvolvimento de conhecimentos importantes que nos permitem a evolução acadêmica. Agradeço aos seus integrantes por terem me acolhido e transferido ensinamentos da prática laboratorial diária.

Ao Douglas por toda dedicação e interesse em compartilhar seus conhecimentos comigo. Não esqueerei dos meus primeiros dias no LIF, você, com toda paciência me trouxe conhecimentos essenciais ao que sei das práticas laboratoriais.

À minha “irmã científica”, Lilian, eu te agradeço por ter tornado meus dias mais alegres no LIF, sempre esforçada e dedicada, agradeço por suas contribuições valiosas no desenvolvimento deste trabalho. Além disso, agradeço pelo seu companheirismo, trazendo palavras amigas em momentos cruciais.

Aos amigos Lifianos, Jefferson Brito, André Vale e Jhonny Ramos, por não medirem esforços para ajudar-me no desenvolvimento deste trabalho.

À Carlene Peixoto, pela atenção e interesse dedicados a cada experimento realizado, providenciando sempre o material necessário.

À Dona Joana, minha primeira companheira nos inícios das manhãs no laboratório, agradeço por todo carinho.

Aos meus amigos da turma 2015 do Mestrado em Ciências da Saúde, com quem eu pude compartilhar dias especiais durante esses dois anos de preparo. Em especial agradeço a Luciana Cavalcane, Benedita Costa e Janete Alencar, a bioestatística nos aproximou e as considero presentes de Deus na minha vida.

À minha querida amiga, Rosana Martins, por todo apoio e incentivo, sempre trazendo pensamentos positivos e não me deixando desistir de realizar meus sonhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e à Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade de prosseguir qualificando minha carreira.

À Capes pela bolsa de Mestrado concedida a mim e à FAPEMA pelo auxílio financeiro ao projeto.

À todos que participaram de alguma forma do processo de desenvolvimento e conclusão desse Mestrado e que sempre foram presentes e cientes do sucesso a ser alcançado no final dessa jornada. Meus sinceros agradecimentos.

*“Apesar dos nossos defeitos
precisamos enxergar que somos pérolas
únicas no teatro da vida e entender que não
existem pessoas de sucesso e pessoas
fracassadas. O que existe são pessoas que
lutam pelos seus sonhos ou desistem
deles.”*

Augusto Cury

RESUMO

SOUSA, K. P. Efeito *in vitro* do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* na indução da polarização de macrófagos para o perfil M1 [Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2017.

A ativação de macrófagos por produtos naturais vem sendo estudada no desenvolvimento ou resolução de diferentes condições patológicas, como uma possibilidade terapêutica imunomoduladora. Uma vez que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (vTs) apresenta potencial ativador e modulador das repostas desses fagócitos, o objetivo deste estudo foi avaliar a polarização de macrófagos murinos tratados com vTs. Para tanto, células de linhagem RAW 264.7 foram estimuladas com vTs (0,1; 1; 10 µg/mL) e/ou LPS (10 µg/mL) por 24 e 48 horas. Após esses tratamentos, foi avaliada: a capacidade fagocítica dessas células frente a partículas de Zymosan (10:1) e *Escherichia coli*-GFP (10:1); a produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e citocinas (IL-6, TNF-α, MCP-1 e IL-12); e a caracterização imunofenotípica (CD80, CD86 e iNOS). O tratamento com o vTs aumentou o potencial fagocítico das células RAW em relação ao Zymosan e *E. coli*. Apesar de ter induzido maior atividade microbicida das células RAW, o tratamento com vTs não induziu, por si só, a produção de NO. No entanto, os grupos estimulados com vTs e LPS, mostraram aumento de NO. Diferente da geração de NO, a produção de H₂O₂ aumentou em todos os grupos de tratamento com o vTs. O veneno induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, mostrando maiores índices para TNF-α e MCP-1. As células estimuladas com veneno, ou veneno e LPS, exibiram um aumento na expressão de CD86 e iNOS. E, de forma significativa, os tratamentos com o vTs apresentaram padrão de resposta semelhante ou superior ao mostrado pelos macrófagos M1, em todos os parâmetros avaliados. Desse modo, nossos dados nos permitem afirmar que o veneno de *T. serrulatus* apresenta ação ativadora sobre os macrófagos RAW 264.7. Ainda, sugerimos que o tratamento com o veneno de *T. serrulatus* mostra potencial indutor de polarização para o perfil M1 de resposta.

Palavras-chave: Modulação. *E. coli*. Fagocitose. Atividade microbicida. Citocinas.

ABSTRACT

SOUSA, K. P. *In vitro* effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on induction of macrophage polarization to M1 profile [Master's Dissertation in Health Sciences]. São Luís: Federal University of Maranhão; 2017.

Macrophage activation by natural products has been studied in development or resolution of several pathological conditions, as an immunomodulatory therapeutic possibility. Since *Tityus serrulatus* scorpion venom (vTs) showed potential to activate and modulate these phagocytes response, this study aimed to evaluate murine macrophages polarization after treatment with vTs. For this, RAW 264.7 lineage cells were stimulated with vTs (0.1; 1; 10 µg / mL) and / or LPS (10 µg / mL) for 24 and 48 hours. After these treatments, we evaluated Zymosan particles (10: 1) and *Escherichia coli*-GFP (10: 1) phagocytosis, nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H₂O₂) and Cytokines (IL-6, TNF-α, MCP-1 and IL-12) production, and immunophenotypic characterization (CD80, CD86 and iNOS). Treatment with vTs was increased RAW cells phagocytic potential to Zymosan and *E. coli*. Although RAW cells increased microbicidal activity, vTs, alone, treatment did not induce NO production. However, groups stimulated with vTs plus LPS showed increased NO. Different from NO generation, all groups treated with vTs showed a stimulation of H₂O₂ production. The venom induced proinflammatory cytokines production, showing higher release of TNF-α and MCP-1. RAW cells stimulated with venom, or venom and LPS, showed an increase in CD86 and iNOS expression. Significantly, vTs treatment presented a response pattern similar or superior to that showed by M1 macrophages, in all evaluated parameters. Thus, our data allow us to affirm that *T. serrulatus* scorpion venom can activate RAW 264.7 macrophages. Furthermore, we suggest that treatment with *T. serrulatus* venom induces polarization for a M1 response profile.

Keywords: Modulation. *E. coli*. Phagocytosis. Microbicidal activity. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diferentes funções do macrófago.....	21
Figura 2: Ativação de macrófagos para o perfil M1 e M2.....	22
Figura 3: Escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	26
Figura 4: Produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos estimulados com veneno de escorpião <i>T. serrulatus</i>	28
Figura 5: vTs não apresenta citotoxicidade sobre células RAW 264.7.....	38
Figura 6: Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs por 24 horas, em presença de partículas de Zymosan.....	39
Figura 7: Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs por 48 horas, em presença de partículas de Zymosan.....	40
Figura 8: Tratamento <i>in vitro</i> com vTs aumenta a fagocitose de Zymosan por macrófagos murinos de linhagem.....	41
Figura 9: Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs por 24 horas, em presença de <i>E. coli</i>	42
Figura 10: Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs por 48 horas, em presença de <i>E. coli</i>	43
Figura 11: Tratamento <i>in vitro</i> com vTs aumenta a fagocitose de <i>E. coli</i> por macrófagos murinos de linhagem.....	45

Figura 12: Tratamento <i>in vitro</i> com veneno de <i>T. serrulatus</i> aumenta o <i>killing</i> de <i>E. coli</i> por macrófagos murinos de linhagem.....	47
Figura 13: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos de linhagem.....	49
Figura 14: Tratamento com vTs aumenta a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos murinos.....	51
Figura 15: Tratamento com vTs aumentou a produção de IL-6, MCP-1 e TNF- α por macrófagos murinos.....	53
Figura 16: vTs aumenta a expressão de iNOS em macrófagos murinos em presença de <i>E. coli</i>	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Medicamentos desenvolvidos a partir de venenos de animais.....25

Quadro 2: Anticorpos, fluorocromo e painéis utilizados para o ensaio de imunofenotipagem.....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI: infusão de cérebro e coração, do inglês *Brain Heart Infusion*

CBA: ensaios de microesferas para citometria, do inglês *Citometric Bead Array*

CLP: Ligadura e Perfuração Cecal, do inglês *Cecal Ligation Puncture*

DHR: Dihydrorhodamine 123

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

fMPL: *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-peneylanine*

FSC: *Forward Scatter*

GMPc: guanilato monofosfato cíclica

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IFN-γ: interferon gama

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase induzível, do inglês *Inducible Nitric Oxide Synthase*

LPS: Lipopolissacarídeo

LT: Leucotrienos

M1: macrófagos clássicos

M2: macrófagos alternativos

MAPK: do inglês: *Mitogen Activated Protein Kinases*

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1, do inglês *Monocyte Chemotatic Protein 1*

METs: armadilhas extracelulares de macrófagos, do inglês *Macrophage Extracellular Traps*

MFI: Média de Intensidade de Fluorescência, do inglês *Average Fluorescence Intensity*

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NF-κB: fator nuclear kappa B, do inglês nuclear fator kappa B

NO: óxido nítrico

NOX: NADPH oxidase

PG: Prostaglandinas

PMA: acetato de forbol miristato, do inglês *phorbol-myristate-acetate*

rpm: rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SBF: soro fetal bovino

SEE: Síndrome do Envenenamento Escorpiônico

SOD: superóxido dismutase

SSC: Side Scatter

SSI: imunomoduladores específicos de local, do inglês *Site Specific Immunomodulators*

TF: Tempo de fagocitose

TGF- β : fator transformador de crescimento beta, do inglês *transforming growth factor beta*

TLR: receptores do tipo Toll

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*

Ts: Fração de veneno do escorpião *Tityus serrulatus*

TT: Tempo total

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

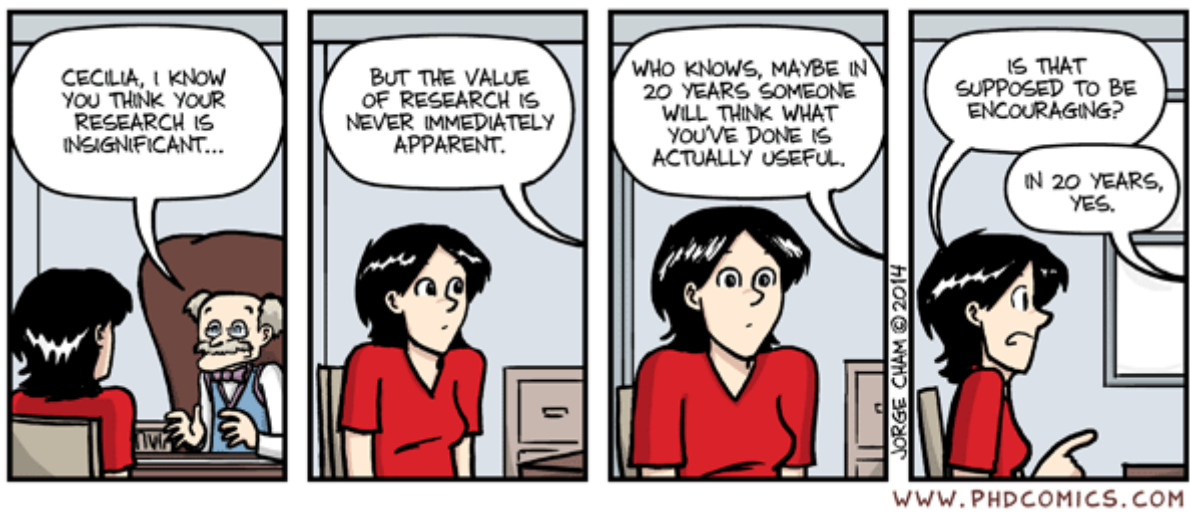
VAMP: padrões moleculares associados ao veneno, do inglês *venon-associated molecular pattern*

vTs: veneno de *Tityus serrulatus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Papel dos macrófagos na resposta imune às infecções.....	20
2.2 Moduladores imunológicos naturais.....	23
2.3 Veneno de escorpião como imunomodulador.....	25
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Veneno de <i>Tityus serrulatus</i>	31
4.2 Cultura da linhagem RAW 264.7.....	31
4.3 Cultura de <i>Escherichia Coli</i>	31
4.4 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	32
4.5 Estimulação <i>in vitro</i>	33
4.6 Avaliação da atividade fagocítica.....	33
4.7 Atividade microbicida.....	34
4.8 Avaliação da produção de óxido nítrico.....	35
4.9 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio.....	35
4.10 Avaliação da produção de citocinas.....	36
4.11 Imunofenotipagem.....	36
4.12 Análise estatística.....	37

5 RESULTADOS.....	38
5.1 Vts não apresenta efeito tóxico sobre células RAW 264.7.....	38
5.2 VTs aumenta a atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7.....	38
5.3 VTS aumenta a atividade microbicida contra <i>E. coli</i>	46
5.4 Produção de óxido nítrico pós tratamento com vTs.....	48
5.5 vTs aumenta produção de peróxido de hidrogênio.....	50
5.6 Tratamento com vTs induz a produção de IL-6, MCP-1 e TNF- α	52
5.7 Expressão de CD80, CD86 e Inos em células RAW 264.7 tratadas com vTs.....	54
 6 DISCUSSÃO.....	 57
7 CONCLUSÃO.....	66
 REFERÊNCIAS.....	 67
APÊNDICES.....	76



1 INTRODUÇÃO

A compreensão de muitas condições patológicas mudou fundamentalmente durante as duas últimas décadas. A inter- e multidisciplinaridade vem agregando novos conhecimentos, e aplicando de forma diferente as noções clássicas, às doenças consideradas definidas em conceito, manifestações clínicas e prognóstico dos pacientes. Nesse sentido, de infecções ao desenvolvimento de tumores, a disfunção ou desregulação do Sistema Imunológico vem sendo mostrada com papel relevante como parte do processo da doença ou de sua resolução.

Desse modo, não só a busca por agentes antimicrobianos antiinflamatórios ou antitumorais é relevante, mas também a pesquisa de produtos que potencializem a resposta imunológica frente a estes desafios. Uma vez que o sistema imunológico é responsável por apresentar respostas a diferentes estímulos, infecciosos ou não, seus mecanismos e componentes devem ser melhor explorados no desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

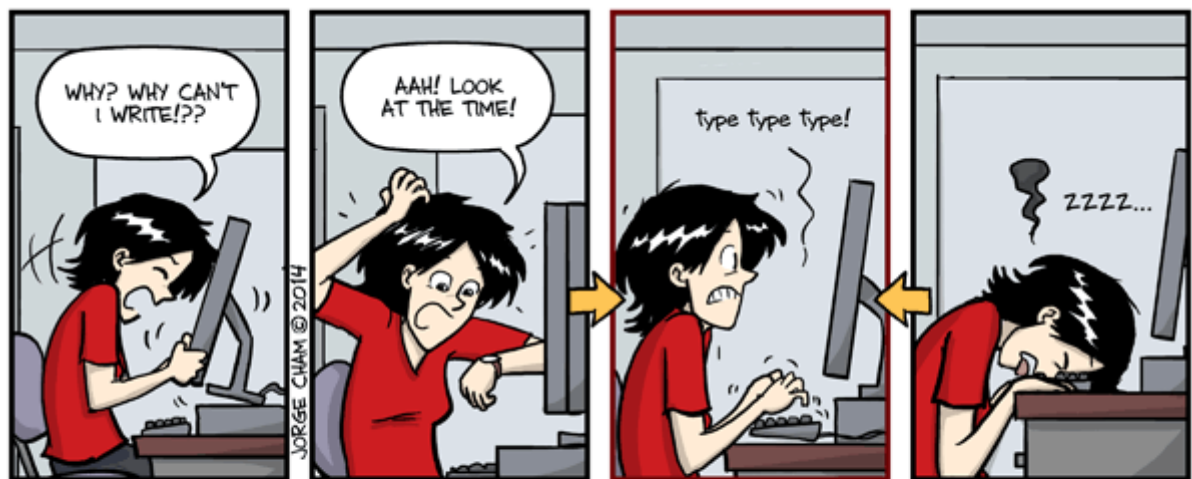
O braço inato do Sistema Imunológico é extremamente relevante no contexto do potencial inflamatório, eliminação de antígenos e regulação da resposta imune para o retorno à homeostase. Fagócitos, como os macrófagos, são muito importantes para o controle e eliminação de patógenos, por exemplo. Estas células apresentam funções, como a fagocitose, produção de espécies reativas (oxigênio e nitrogênio) e secreção de citocinas, que constituem uma mecanismos efetores rápidos e eficazes. Ainda, o perfil de polarização dos macrófagos influencia diretamente no desfecho da resposta em curso, uma vez que o macrófago de perfil M1 apresenta-se mais inflamatório e citotóxico, e o macrófago de perfil M2 apresenta-se mais regulador ou mesmo supressor da resposta imune (MILLS; LEY, 2014).

No contexto do desenvolvimento de intervenções ou adjuvantes terapêuticos baseados na modulação do sistema imunológico, como na ativação e polarização de macrófagos, os produtos naturais tem apresentado papel de destaque. O veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, por exemplo, é um produto natural que tem propiciado resultados relevantes. Este é relatado como um importante imunomodulador, uma vez que apresenta potencial para induzir a produção de Óxido Nítrico (NO) e a secreção de citocinas, como IL-1 α , IL-1 β , IL-6,

IL-8, fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) (MEKI; EL-DEAN, 1998; FUKUHARA *et al.*, 2003).

Nosso grupo de pesquisa realizou, recentemente, diferentes trabalhos evidenciando o papel do veneno de *T. serrulatus* no sistema imunológico. Fialho *et al.* (2011) observaram que a administração subcutânea do veneno de *T. serrulatus* não causou inflamação local, mas alterou a celularidade na medula, linfonodos e baço, bem como aumentou as citocinas IL-6, TNF- α e IL-10 no soro. Em outro trabalho do grupo, Cardoso (2014) demonstrou o potencial leishmanicida do veneno. No referido trabalho, foi evidenciada a redução da infecção por *Leishmania amazonensis* de macrófagos estimulados *in vitro* com o veneno, nas doses de 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$. Ainda, Maciel *et al* (2014) demonstraram o efeito protetor da administração subcutânea do veneno de *T. serrulatus* na sepse por CLP (Ligadura e Perfuração Cecal). Camundongos pré-tratados com vTs sobreviveram por mais tempo após CLP, além de apresentarem redução considerável do edema pulmonar, característico em quadros de sepse.

Como demonstrado por nosso grupo de pesquisa, o veneno de *T. serrulatus* apresenta ações moduladoras importantes sobre o Sistema Imunológico. Estas ações podem envolver a polarização M1/M2 dos macrófagos, o que possibilita não só a identificação do contexto imunológico das respostas inatas, mas também a aplicação de marcadores biológicos dos macrófagos (e.g. citocinas, espécies reativas, moléculas de superfície) para a terapêutica, além do diagnóstico e prognóstico clínico. Dessa forma, propomos nesse trabalho a ativação de macrófagos murinos RAW 264.7 pelo tratamento *in vitro* com veneno de *T. serrulatus*, levando-os à polarização para um perfil M1 protetor em relação à infecção por *Escherichia coli*.



WRITING: THE THING THAT HAPPENS IN BETWEEN EXHAUSTING
YOUR DEADLINE AND EXHAUSTING YOURSELF.

WWW.PHDCOMICS.COM

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Papel dos macrófagos na resposta imune às infecções

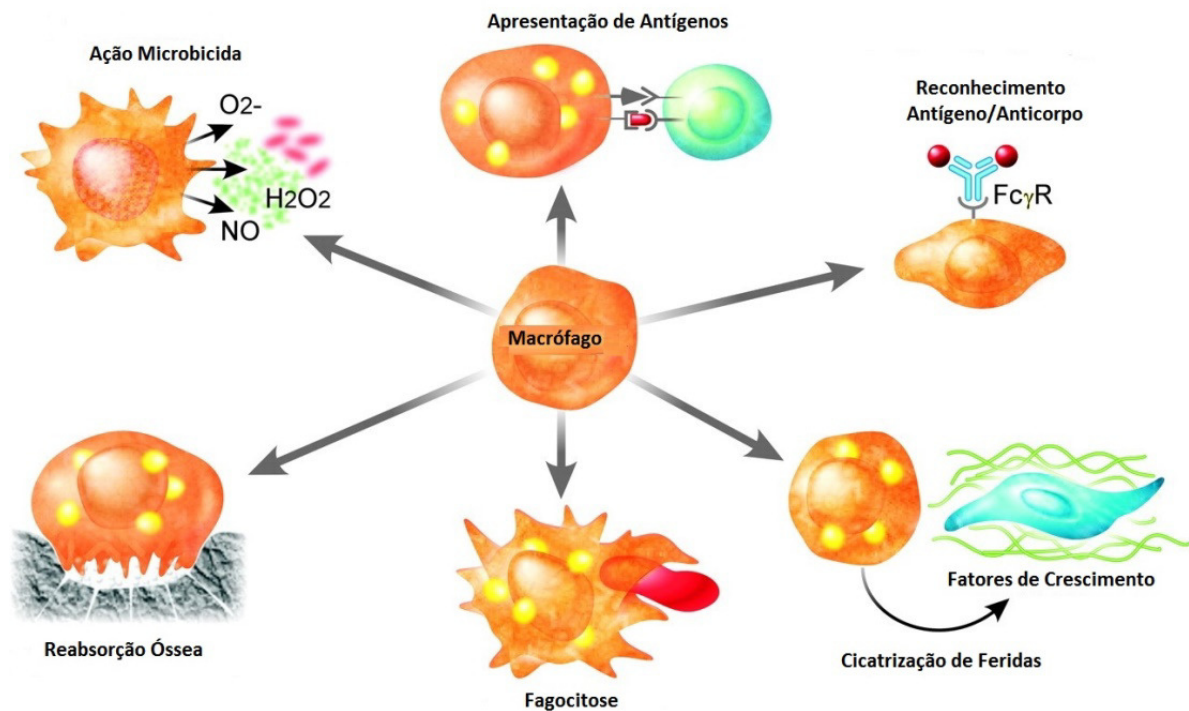
A imunidade inata é a primeira linha de resposta à patógenos. Em condições nas quais as barreiras físicas, pele ou mucosa, são lesionadas, células desse braço da resposta imune agem para eliminar o microrganismo invasor potencialmente patogênico (FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Dentre estas células algumas apresentam destaque na resposta imune inata: os neutrófilos, fagócitos polimorfonucleares com grande potencial migratório em direção aos locais da infecção e inflamação, apresentando mecanismos microbicidas primordiais e eficazes; as células dendríticas, principais células apresentadoras de antígenos, que atuam na ativação dos linfócitos T, iniciando a resposta imune adaptativa; e os monócitos/macrófagos, células plásticas do ponto de vista morfológico e funcional, apresentando funções microbicidas, atuam também apresentando antígenos aos linfócitos e regulando a resposta imunológica (GORDON, 2012).

Estes fagócitos mononucleares, presentes constitutivamente nos tecidos, respondem rapidamente aos microrganismos. Os macrófagos podem ser ativados por uma variedade de estímulos, assumindo diferentes formas e funções (GORDON *et al.*, 2014). Apresentam denominações especiais em diferentes tecidos, por exemplo: no sistema nervoso central, são chamados de células da micróglia; quando revestem os sinusoides vasculares do fígado, são denominados de células de Kupffer; nas vias aéreas pulmonares, são chamados macrófagos alveolares; e fagócitos multinucleados no tecido ósseo são denominados osteoclastos (YAMASAKI *et al.*, 2014).

O papel dos macrófagos é fundamental na resposta a infecções por patógenos, como as bactérias, uma vez que apresentam mecanismos microbicidas diversificados e eficazes. Uma das principais características dos macrófagos é o elevado potencial fagocítico, que constitui um primeiro passo para a efetiva eliminação de patógenos. Dentre esses mecanismos, podemos citar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e liberação de armadilhas de DNA extracelular (METs, *Macrophage Extracellular Traps*) (WEISS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2014). Ainda, sua ativação leva à produção de mediadores da resposta imune, como citocinas e eicosanoides, com grande potencial para o estabelecimento de um

quadro inflamatório/citotóxico ou mesmo levar à regulação do sistema imunológico, inibindo-o (Figura 1) (CHAWLA, 2010).

Figura 1 – Diferentes funções dos macrófagos



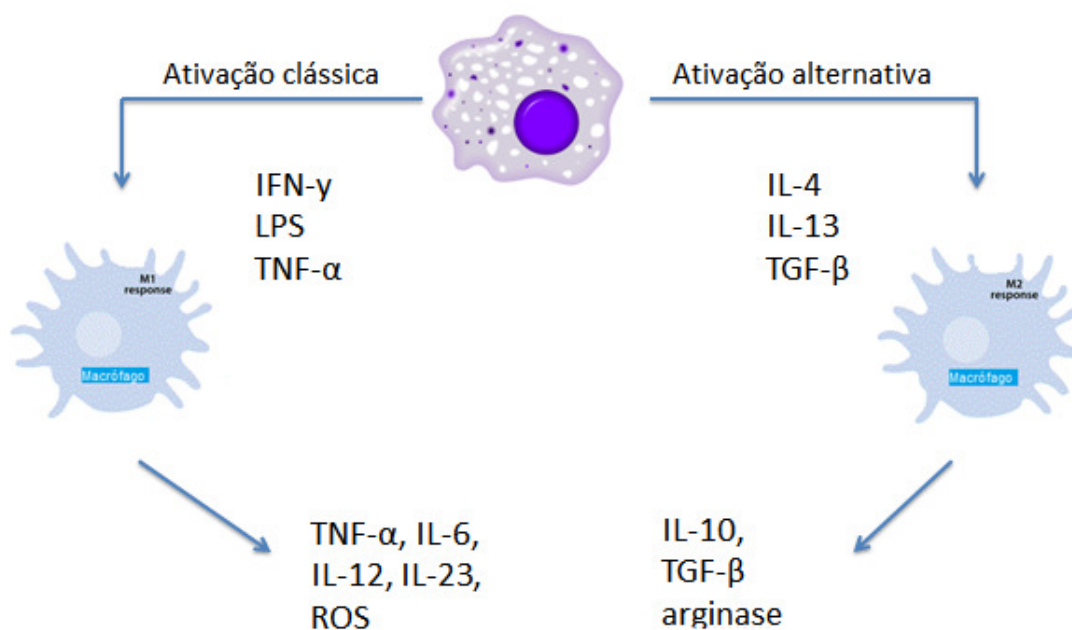
Fonte: adaptado de Chawla, 2010

Os macrófagos ativam estes mecanismos celulares (e.g. fagocitose) e moleculares (e.g. produção de diferentes citocinas) em respostas distintas de acordo com o estímulo a ele apresentado. Nesse contexto, foram caracterizados perfis de polarização de reposta dos macrófagos para prover defesa ao hospedeiro ou manter a homeostase do tecido, chamados, respectivamente, de M1 e M2 (MILLS; LEY, 2014). Estas células apresentam uma maquinaria metabólica única (plasticidade), que lhes permite mudar rapidamente de um modo M2 (fase de resolução inflamatória) para um modo M1 (resposta citotóxica) em presença de um estímulo específico (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Macrófagos ativados classicamente em resposta a produtos microbianos, como o LPS, ou interferon- γ (IFN- γ) são denominados M1 e caracterizados pela alta capacidade de apresentação de antígenos; alta produção de citocinas inflamatórias,

por exemplo IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-23 (PORTA *et al.*, 2009; GORDON e TAYLOR, 2005) e alta capacidade citotóxica via produção de EROs e óxido nítrico (NO). Enquanto que macrófagos ativados “alternativamente”, em presença de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, são denominados M2 e caracterizados pela alta produção de IL-10, apresentando um perfil regulador ou mesmo voltado para o reparo tecidual (Figura 2) (MARTINEZ *et al.*, 2006; KOMOHARA *et al.*, 2008).

Figura 2 – Ativação de macrófagos para os perfis M1 e M2



Fonte: adaptado Martinez *et al.*, 2009

O prognóstico de determinadas infecções ou quadros associados à estas, como a sepse, vem sendo relacionado à polarização de macrófagos. Células do tipo M1 possuem alto poder bactericida, porém, sua ativação prolongada causa efeitos deletérios ao organismo humano; enquanto que células M2 estão relacionadas à fase de resolução do processo inflamatório por promoverem imunossupressão (MANTOVANI *et al.*, 2002; 2013). Um exemplo dessa relação, são os dados recentes que mostram que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, na sepse, favorece a mudança de um perfil M1 para um perfil M2 (KORNS *et al.*, 2011; VON KNETHEN *et al.*, 2013). Essa alteração para o perfil M2 induz uma resposta reguladora antiinflamatória, diminuindo as manifestações sistêmicas associadas à sepse.

Da mesma forma, em quadros de infecções locais, com manifestações sistêmicas brandas, a polarização dos macrófagos para um perfil M1 promove um melhor prognóstico para o paciente (SICA; MANTOVANI, 2012). Os macrófagos M1 apresentam expressão da enzima NO sintase induzível (do inglês, iNOS) e consequente produção de NO. Além de liberar citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IL-12), induz uma reposta contra o patógeno e aumenta a possibilidade de eliminação do agente infeccioso (MANTOVANI *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2009). Dessa forma, a modulação da resposta dos macrófagos para um perfil M1 ou M2 apresenta-se como um nicho para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e mesmo terapias para diferentes patologias envolvendo o Sistema Imunológico.

2.2 Moduladores imunológicos naturais

Um modulador imunológico pode ser definido como uma substância biológica ou sintética, que estimula ou suprime a resposta inata e/ou adaptativa (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003). Diferentes compostos sintéticos têm sido descritos na literatura com propriedade imunomoduladora (SULTANA; SAIFY, 2012). Um dos exemplos é o Levamisole, uma droga antiparasitária, que ativa macrófagos e monócitos, aumentando sua atividade contra helmintos (HEGDE *et al.*, 2012). No entanto, efeitos colaterais importantes, como teratogênese e carcinogênese, já foram descritos em relação aos moduladores imunológicos sintéticos (BASCONES-MARTINEZ *et al.*, 2014).

Efeitos de imunomoduladores naturais sobre a polarização de macrófagos, em diferentes contextos, vem sendo demonstrados. Bressler *et al.* (2015), utilizando células monocíticas humanas THP-1, demonstraram que o SSI QBECO (derivado de *E. coli* comum de cólon) ativa macrófagos para o perfil M1 (associado com a maior capacidade de eliminar bactérias e ativar a reposta imune inata). De forma semelhante, o *imprime* IPGG, um beta-glucano imunomodulador derivado de leveduras, apresentou potencial para induzir a repolarização M2 para M1 e direcionar a resposta adaptativa para um perfil Th1 (CHAN *et al.*, 2014).

Diferentes iniciativas são desenvolvidas na tentativa de encontrar terapias, que visem modular a resposta dos macrófagos, consequentemente sua polarização, diante de determinadas doenças. Nosso grupo de pesquisa tem verificado efeitos de produtos naturais sobre as funções de macrófagos, como: o efeito anti-tumoral de *Orbignya phalerata* (FORTES *et al.*, 2009) e *Chenopodium ambrosioides* (NASCIMENTO *et al.*, 2006); a atividade anti-inflamatória e atividade anti-séptica de *Atalea speciosa* (NASCIMENTO *et al.*, 2010); a ação anti-inflamatória do própolis de abelhas e seus subprodutos (MACHADO *et al.*, 2012; FARIAS *et al.*, 2014).

Dessa forma, os produtos naturais apresentam-se como uma fonte importante de princípios ativos com potencial imunomodulador, capazes de induzirem respostas imunes inatas. Para ser considerado um imunomodulador, o produto precisa apresentar características como a aumento direto da ativação de células efectoras, ou produção de mediadores solúveis, como as citocinas, redução de mecanismos supressores, promovendo o aumento da resposta imune do hospedeiro (MORETÃO *et al.*, 2004).

Apesar da maior veiculação na mídia de informações sobre produtos naturais de origem vegetal, geralmente citados como fitoterápicos, existem compostos de origem animal com eficientes ações sobre o Sistema Imunológico e propriedades imunomoduladoras. Algumas peçonhas têm sido amplamente reconhecidas como fontes de moléculas bioativas naturais imunomoduladoras (OMAR; EL-DIN, 2013). Desde o desenvolvimento do anti-hipertensivo Captopril®, que possui como princípio ativo um peptídeo isolado do veneno da *Bothrops jararaca*, outros medicamentos derivados de peptídeos de venenos de animais já foram liberados para comercialização (PIMENTA; LIMA, 2005). No Quadro 1, encontram-se listados os primeiros fármacos produzidos a partir de peptídeos de venenos de animais.

Quadro 1 – Medicamentos desenvolvidos a partir de venenos de animais

Animal	Serpente <i>Bothrops jararaca</i>	Serpente <i>Sistrurus miliarius barbouri</i>	Caramujo marinho <i>Conus magus</i>	Lagarto <i>Holoderma suspectum</i>
Fármaco	Captopril®	Integrilin™	Prialt®	Byetta®
Mecanismo de ação	Inibidor da enzima conversora de angiotensina	Inibidor de glicoproteínas plaquetárias	Bloqueia os canais de cálcio dependente de voltagem	Antagonista do glucagon
Indicação	Hipertensão	Doenças coronárias	Dor crônica	Diabetes Melitus tipo 2

Fonte: Pimenta e Lima, 2005

2.3 Veneno de escorpião como imunomodulador

Dentre os animais com veneno composto por princípios ativos com potencial imunomodulador, o escorpião da espécie *Tityus serrulatus* vem apresentando destaque em pesquisas científicas. A espécie *T. serrulatus* mede entre 6 e 7 cm, possui uma coloração marrom-escuro e pedipalpos e patas amarelados. A cauda, que também é amarelada, apresenta uma serrilha dorsal nos dois últimos segmentos e uma mancha escura no lado ventral da vesícula (Figura 3). Esta espécie ocorre na Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo, Sergipe, Rio Grande do Sul e Paraná. (BRASIL, 2001).

Figura 3 – Escorpião *Tityus serrulatus*

Fonte: Manual de Escorpiões (2009)

O veneno dos escorpiões é constituído principalmente por um conjunto de neurotoxinas peptídicas, que formam seu principal componente tóxico. Essas toxinas apresentam propriedades farmacológicas heterogêneas, com algumas sendo mais ativas em mamíferos, outras mais ativas em artrópodes e outras que podem atuar sobre ambos (COURAUD *et al.*, 1984; PINTAR *et al.*, 1999; GUREVITZ *et al.*, 2007). Além das neurotoxinas, o veneno escorpiônico também apresenta uma ampla diversidade de moléculas como mucopolissacarídeos, hialuronidasas, fosfolipases, serotonina, inibidores de proteases e liberadores de histaminas, que exercem uma ação local como coadjuvantes no envenenamento, ajudando a aumentar a absorção e disseminação do veneno (POSSANI *et al.*, 1999; PESSINI *et al.*, 2001).

Todas as espécies consideradas de relevância médica no Brasil fazem parte do gênero *Tityus*, compreendendo as espécies *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus obscurus* e *Tityus stigmurus* como as mais significativas (WEN; SANTALUCIA, 2005). Entre as 4 espécies citadas, o *T. serrulatus* é considerado o

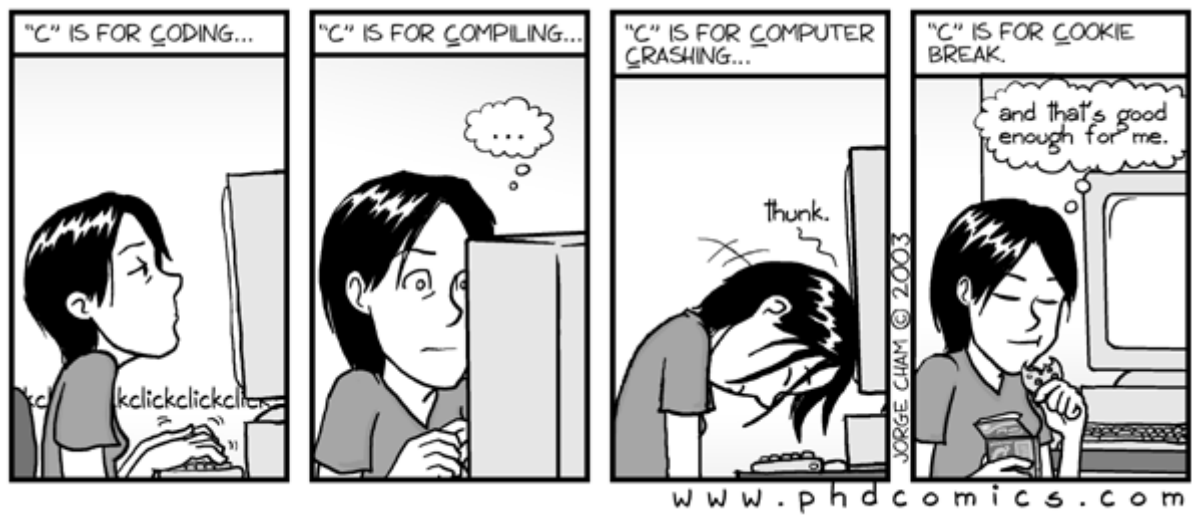
mais perigoso. Acidentes ocasionados pela sua picada podem levar ao envenenamento letal, especialmente em crianças, pois seu veneno apresenta maior toxicidade quando comparado ao de outras espécies. Além disso, *T. serrulatus* apresenta maior frequência entre os envenenamentos causados por escorpiões, sendo esta espécie responsável por 95% dos acidentes registrados (DORCE; SANDOVAL, 1992; SOARES *et al*, 2002; WEN; SANTALUCIA, 2005; COLOGNA *et al*, 2009).

Durante a Síndrome de Envenenamento Escorpiônico (SSE), é confirmada a presença aumentada de Óxido Nítrico (NO), das interleucinas (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon- γ (INF- γ). Esses mediadores estão diretamente relacionados com a resposta pró-inflamatória e apresentam um papel fundamental nas manifestações sistêmicas do envenenamento (FUKUHARA *et al*, 2003).

Como citado, o veneno de *T. serrulatus* apresenta potencial em modular o Sistema Imunológico, de forma relacionada com a ativação dos fagócitos mononucleares. Segundo Petricvich (2002), macrófagos estimulados *in vitro* pelo veneno de *T. serrulatus*, apresentaram-se ativados, liberando peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Zoccal *et al* (2011) descreveram o potencial do veneno de escorpião *T. serrulatus* e suas frações (Ts1, Ts2 e Ts6) em induzir a ativação de macrófago e a inflamação por mecanismos dependentes de mediadores lipídicos e produção de citocinas. Em outros estudos fica demonstrada a capacidade do veneno em induzir a produção de NO, IL-6 e TNF- α , e também mediadores inflamatórios lipídicos, como prostaglandinas (PG) E2 e de leucotrieno (LT) B4 (ZOCCAL *et al*, 2016). Ainda, a ação do veneno de *T. serrulatus* foi relacionada às vias dependentes de receptores do tipo *Toll* (do inglês, TLR *toll-like receptors*) 2 (TLR2) e 4 (TLR4), e de CD14 (Figura 4), como MAPK e NF- κ B, (ZOCCAL, 2014).

e IL-10). Em estudo mais recente, Maciel *et al* (2014) demonstraram os efeitos protetores da administração subcutânea do veneno de *T. serrulatus* em sepse por CLP (Ligadura e Perfuração Cecal). O veneno, injetado 6 horas antes da CLP, protegeu os animais contra inflamação pulmonar e morte causados por septicemia.

Como demonstrado, o veneno de *T. serrulatus* apresenta importantes ações moduladoras sobre o Sistema Imunológico. O mesmo pode apresentar ação ativadora sobre componentes inatos da imunidade ou mesmo regular negativamente a resposta inflamatória, controlando-a. Dessa forma, avaliamos os efeitos *in vitro* do veneno sobre o perfil de atividade fagocítica e microbicida, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, liberação de citocinas e expressão de marcadores M1/M2. No presente trabalho, buscamos agregar conhecimento sobre a ação do veneno de *T. serrulatus* em relação ao aspecto funcional de macrófagos (RAW 264.7), definindo seu perfil de polarização M1/M2, em resposta contra *E. coli*.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* sobre a polarização e funções de macrófagos murinos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade fagocítica de macrófagos tratados com veneno de *T. serrulatus*, em relação a Zymosan e *E. coli*;
- Investigar a capacidade microbicida dos macrófagos tratados com veneno da espécie *T. serrulatus*;
- Identificar a capacidade do veneno de *T. serrulatus* em induzir polarização de macrófagos para os perfis M1 ou M2;

What your research supposedly looks like:

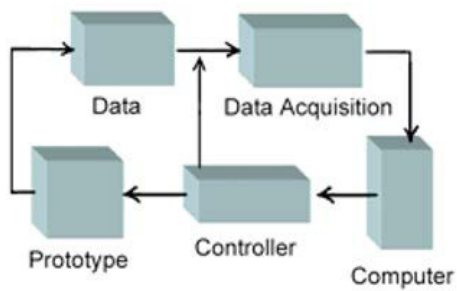


Figure 1. Experimental Diagram

What your research *actually* looks like:

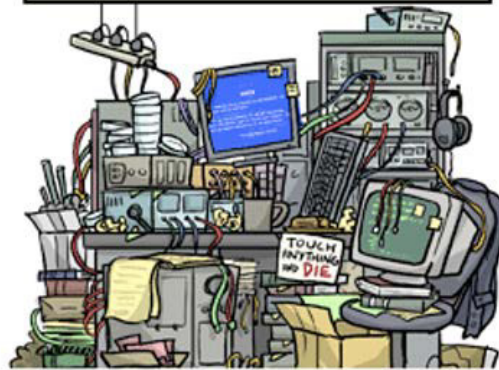


Figure 2. Experimental Mess

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Veneno de *Tityus serrulatus* (vTs)

O veneno bruto liofilizado do escorpião *Tityus serrulatus* (vTs) foi obtido do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan. O veneno encontra-se armazenado à -20 °C, sendo reconstituído em meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) para as concentrações de uso de 0,1 µg/mL, 1,0 µg/mL e 10 µg/mL. A reconstituição do veneno é realizada somente no momento de seu uso, evitando, deste modo, degradação de seus componentes.

4.2. Cultura da linhagem RAW 264.7

As células da linhagem de macrófago murino RAW 264.7, cedidas gentilmente pelo Professor Dr. Wanderson Pereira, foram mantidas em meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH), suplementado com soro fetal bovino (SFB, SIGMA) a 10%, 2 mM de L-glutamina (SIGMA-ALDRICH), 1% de estreptomicina (100 µg/mL, MERCK) e penicilina G (100 U/mL, SIGMA-ALDRICH), em estufa com atmosfera úmida de 5% CO₂, a 37 °C. Aproximadamente, a cada semana de cultura, quando as células apresentaram confluência, as mesmas foram removidas mecanicamente utilizando-se *cell scraper*. A suspensão de células removida foi transferida para tubo cônico de polietileno de 15 mL contendo 10 mL de meio RPMI, suplementado como descrito anteriormente. As células foram centrifugadas (172 x g por 10 minutos, a 25°C) e o sobrenadante descartado. Após a centrifugação, os macrófagos foram ressuspensos em 1 mL de meio RPMI suplementado, contados ao microscópio óptico de luz comum, em câmara de Neubauer, usando a técnica de exclusão por coloração com solução de azul de tripan 0,4% (SIGMA-ALDRICH). As concentrações de células foram ajustadas de acordo com os ensaios realizados.

4.3. Cultura de *Escherichia Coli*

Para os ensaios com bactéria, utilizamos a cepa 352 de *E. coli*. Esta, não patogênica e foi mantida em meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*, DIFCO), em freezer a -20 °C. A partir desta cultura estoque, 18 horas antes do ensaio, foram feitos repiques em tubos contendo 5 mL de meio líquido BHI, que foram incubados a

37 °C, até o momento do experimento. A suspensão de bactérias foi, após incubação, lavada (172 x g por 10 minutos, a 25 °C) e ressuspendida em PBS (Solução Tamponada com Fosfato – pH 7,4). A concentração foi ajustada para 1×10^8 bactérias/mL, definida por medição da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384), a 600 nm de comprimento de onda.

4.4 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o ensaio colorimétrico baseado no sal de tetrazólio, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio) (MOSMANN, 1983). Para isso, as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços e fundo chato a uma concentração de 1×10^6 células/mL, e incubadas por uma hora em meio RPMI, a 37 °C, com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período inicial de incubação, as células aderentes foram tratadas com diferentes concentrações do vTs (0,1, 1 e 10 µg/mL). Após vinte e quatro horas, foram adicionados aos poços de cultivo celular, 10 µL de MTT (5 mg/mL), e após 3 h de incubação com o MTT foram acrescentados 100 µL de SDS a 20%, diluído em HCl (0,01 N). A quantificação da DO foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax® Plus 384). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular, e esta foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Absorbância do Tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

Todos os dados obtidos foram comparados com o grupo controle negativo, constituído apenas de meio RPMI completo e macrófagos, e com o grupo controle positivo, ao qual fora acrescentado Triton X100 (1%) por 3 minutos.

4.5 Estimulação *in vitro*

Células RAW 264.7 foram transferidas para placas de cultura de 48 ou 96 poços de fundo chato, em triplicata, na concentração de 1×10^6 células/mL para ambas as placas. Após o ajuste de concentração de células e plaqueamento, estas foram estimuladas com as concentrações de 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL do veneno de *T. serrulatus* (vTs) ou com vTs, nas três concentrações citadas, mais lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS; 10 µg/mL; SIGMA-ALDRICH). As células foram mantidas sob esta estimulação por 24 ou 48 horas, em ambiente saturado contendo 5% de CO₂, a 37 °C. Após este período, o sobrenadante da cultura foi coletado e congelado em freezer a -80 °C para posterior análise de citocinas e as células foram avaliadas nos testes descritos a seguir. Além dos tratamentos com o veneno, utilizamos LPS na concentração de 10 µg/mL, como controle positivo dos ensaios. Ainda, os macrófagos foram estimulados com Interferon gama (IFN-γ; 10 ng/mL) e LPS (200 ng/mL), definindo o perfil de polarização M1, ou IL-13 (20 ng/mL) associada à IL-4 (40 ng/mL), definindo o perfil de polarização M2.

4.6 Avaliação da atividade fagocítica

O ensaio de fagocitose utilizado foi adaptado, no Laboratório de Imunofisiologia, a partir dos métodos descritos por Pinello *et al* (2006). Após serem estimulados com o veneno de *T. serrulatus* e/ou LPS, nas concentrações citadas no tópico 4.5, por 24 ou 48 horas, os macrófagos RAW 264.7 (1×10^6 /mL) foram incubados por uma hora, a 37°C, com Zymosan A (SIGMA-ALDRICH) ou *E. coli* expressando GFP (plasmídeo contendo o gene para *green fluorescent protein*, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Júnior). As incubações foram feitas em uma proporção de 10 partículas de Zymosan ou bactérias para cada célula (10:1). Não foi efetuada opsonização para este ensaio. A incubação foi realizada sobre lamínulas redondas de vidro (13 mm), no fundo de poços de placas de 24 poços, para agilizar a montagem e análise das lâminas. Após a incubação, as células foram fixadas, ainda nos poços das placas, utilizando-se paraformaldeído a 4%. As lamínulas foram, então, lavadas em água destilada, dispostas e fixadas sobre lâminas de vidro para observação em microscópio óptico. Para análise da

fagocitose, foram contadas 200 células, em campos pré-definidos (marcações pelos eixos X e Y, em milímetros, definidas no Chariot do microscópio) (MAMNUR RASHID *et al*, 2002). Utilizou-se a técnica de contraste de fase para melhor discriminação das partículas englobadas daquelas apenas aderidas à membrana dos macrófagos (KRESINSKY, 2016) Desse modo, pode-se definir o percentual de células que exerceram a atividade fagocítica, bem como o número de partículas englobadas.

4.7 Atividade microbicida

As células RAW 264.7 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram estimuladas em placas de 96 poços conforme o item 4.5, por 24 horas. Paralelamente, preparou-se a cultura de *E. coli* conforme o item 4.3. Após a incubação, as bactérias, em proporção de 10:1, foram adicionadas à cultura de macrófagos e mantidas por 30 (para avaliação de fagocitose), 60, 90 e 120 (para análise da atividade microbicida) minutos, a 37 °C. Após cada um dos intervalos de tempo, as placas contendo as suspensões de bactérias/fagócitos foram retiradas da estufa, colocadas em banho de gelo por 10 minutos para parar a atividade celular e centrifugadas (15 minutos, $160 \times g$, 4°C). Após centrifugação, o precipitado celular foi ressuspensionado em meio RPMI contendo 200 µg/mL de gentamicina, por 40 minutos, para eliminação das bactérias extracelulares. Após esse período, fez-se duas lavagens e ressuspendeu-se o precipitado em Triton X100 (1%) deixando-o agir por 10 minutos (recuperação das bactérias fagocitadas). Após este tempo, fez-se uma lavagem com PBS e o precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de PBS. Uma alíquota de 10 µL de cada grupo de tratamento foi retirada, diluída seriadamente (em PBS até 10^4 vezes), para obtenção de colônias isoladas, e plaqueada por esgotamento em placa de Petri contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion*, MERCK). As placas foram então incubadas por 18 horas, a 37°C. Após o período de incubação, procedeu-se a contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colônias) para determinação da fagocitose e atividade microbicida. A avaliação se deu pela porcentagem das quantidades de UFC nos tempos de 60, 90 e 120 minutos (TT, tempo total de atividade microbicida) em relação à quantidade de UFC no tempo de 30 minutos (TF, tempo de fagocitose), expressos pela fórmula:

$$\% \text{ Atividade Microbicida} = 100 - \left[\frac{\text{TT} \times 100}{\text{TF}} \right]$$

4.8 Avaliação da produção de óxido nítrico

Para essa avaliação, as células RAW 264.7 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram cultivadas e estimuladas (tópico 4.5) em placas de 96 poços com meio RPMI 1640 suplementado como descrito anteriormente (tópico 4.2), por 48 horas, a 37°C , em ambiente úmido saturado com 5 % de CO_2 . Após o tratamento, 50 μL do sobrenadante foram coletados e incubados com igual volume de reagente de Griess (1 % sulfanilamida / 0.1 % dihidroclorato de diamina naftaleno / 2,5 % H_3PO_4), por 10 minutos, a 22°C , para quantificar o acúmulo de nitrito. Após o tempo de reação, a absorbância foi determinada a um comprimento de onda de 550 nm, em espectrofotômetro de microplacas. A conversão de absorbância para concentração em micromolar (μM) de NO_2^- foi realizada pela comparação com as leituras obtidas em uma curva padrão de concentrações estabelecidas (5-60 μM) de nitrito de sódio diluído em meio RPMI.

4.9 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Após a incubação para estimulação e retirada do sobrenadante para avaliação da produção de óxido nítrico, as mesmas células utilizadas no ensaio anterior (tópico 4.8) foram empregadas neste experimento. Estas células foram incubadas em estufa a 37°C , em presença de DHR (Dihydrorhodamine 123; 375 ng/mL; SIGMA-ALDRICH), por 10 minutos, para a avaliação da produção de H_2O_2 . Após esse tempo de reação com o DHR, foi adicionado o estímulo secundário com éster de forbol, Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA; 50 nM; SIGMA-ALDRICH), por uma hora, em estufa a 37°C . A placa foi então retirada da estufa e colocada em gelo, parando as reações e desprendendo as células aderidas no fundo dos poços da placa. Após a recuperação das células, estas foram transferidas para uma placa

de 96 poços com fundo em “U” para leitura em citômetro *Guava*®. Para análise, 5000 eventos foram adquiridos levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e complexidade celular (*Side Scatter*, SSC) para estabelecimento do *gate* de aquisição. Posteriormente, os dados foram analisados no software FlowJo v 10.0 (TREE STAR INC.) e expressos em média de intensidade de fluorescência (MFI) e percentual de células expressando a marcação com DHR.

4.10 Avaliação da produção de citocinas

A quantificação de citocinas secretadas (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70) foi avaliada pela técnica que utiliza *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Pharmingen), com o kit *inflammation*, em sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7. Os sobrenadantes foram obtidos a partir das culturas de células estimuladas somente com o veneno (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$) ou este em conjunto com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) ou *E. coli* (10:1). A estas amostras foram adicionados 25 μL do padrão fornecido pelo fabricante, misturando-as com os reagentes de detecção provenientes do kit. As amostras foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente, em local protegido da luz. Após a incubação, as amostras foram suspensas em 500 μL de tampão de lavagem e centrifugadas a 200 x g, por 5 minutos. Após a lavagem, as amostras foram ressuspensas em 150 μL de tampão de leitura e avaliadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). Para início das análises, o citômetro foi calibrado seguindo as instruções do fabricante. Após a leitura dos padrões e amostras, os dados foram analisados com o software *FCAP Array*™ v3.0 (BD Biosciences). Os resultados gerados encontram-se expressos em pg/mL para cada uma das citocinas.

4.11 Imunofenotipagem

Para avaliação fenotípica, as células RAW 264.7 ($1 \times 10^6/\text{mL}$), estimuladas somente com o veneno (0,1 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) ou em conjunto com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) ou *E. coli* (10:1), por 24 ou 48 horas, foram ressuspensas em 100 μL de PBS e transferidas para uma placa de fundo redondo. Nestas placas, as células foram marcadas com os anticorpos específicos (BD Biosciences; Quadro 2) e

incubadas a 4 °C por 15 minutos, em ambiente protegido da luz. As amostras foram avaliadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e os dados analisados com o programa FlowJo v 10.0 (TreeStar). Para análise, 10000 eventos foram adquiridos levando-se em consideração os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter*, FSC) e complexidade celular (*Side Scatter*, SSC) para estabelecimento do *gate* de aquisição. Após a determinação do *gate* principal, as células foram avaliadas segundo os canais de fluorescência utilizados, gerando histogramas para determinação e análise de percentual de células expressando os marcadores e média da intensidade de fluorescência (MFI) (APÊNDICE A).

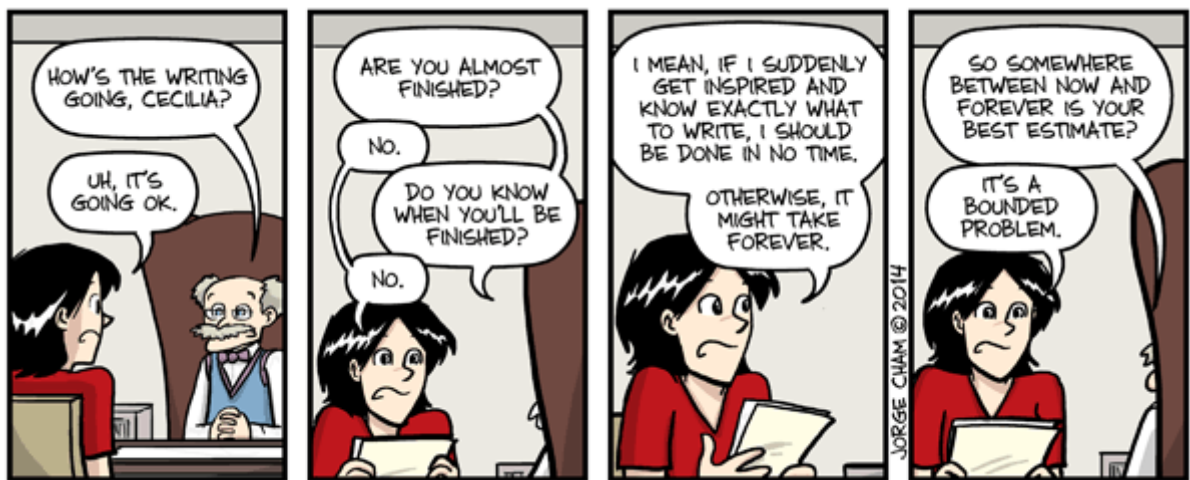
Quadro 2– Anticorpos, fluorocromo e painéis utilizados para o ensaio de imunofenotipagem

Painéis/Fluorocromo	FITC	PE	PerCP-Cy5.5
Painel 1	CD206	CD86	F4/80
Painel 2	CD206	CD80	F4/80
Painel 3	CD206	CD86/80	iNOS*

* marcação intracelular

4.12 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos uma vez, gerando um número amostral que garantisse adequada análise estatística. Após a obtenção dos dados brutos (dados numéricos dos parâmetros analisados), procedemos a análise de distribuição destes por teste de normalidade Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, aplicamos o teste *one-way* ANOVA, com pós-teste de Tukey. Ainda, procedemos o teste *t de student* para uma avaliação a cada dois grupos de tratamento, aumentando a segurança em relação à análise global dos dados. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, a probabilidade de $p < 0,05$ capaz de revelar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os dados dos diferentes grupos. Os dados encontram-se expressos em média $\pm$ desvio padrão. As análises foram realizadas nos programas Excel 14.6.8 (Microsoft) e Prism 7.00 (GraphPad Software Inc.).

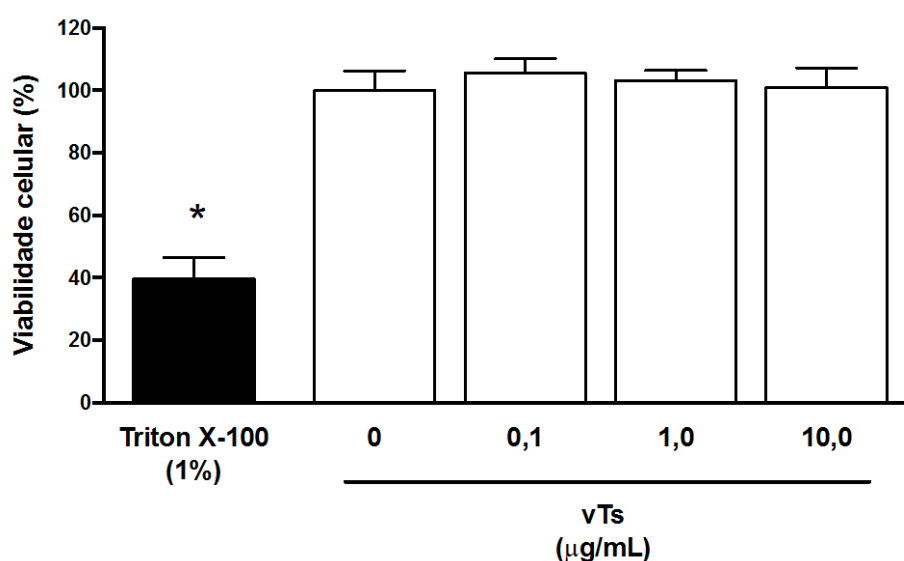


5 RESULTADOS

5.1 vTs não apresenta efeito citotóxico sobre células RAW 264.7

Os resultados da viabilidade celular nos mostram que o veneno do escorpião *T. serrulatus*, nas concentrações utilizadas nos experimentos (0,1, 1,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$), não alterou a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 (Figura 5).

Figura 5 – vTs não apresenta citotoxicidade sobre células RAW 264.7

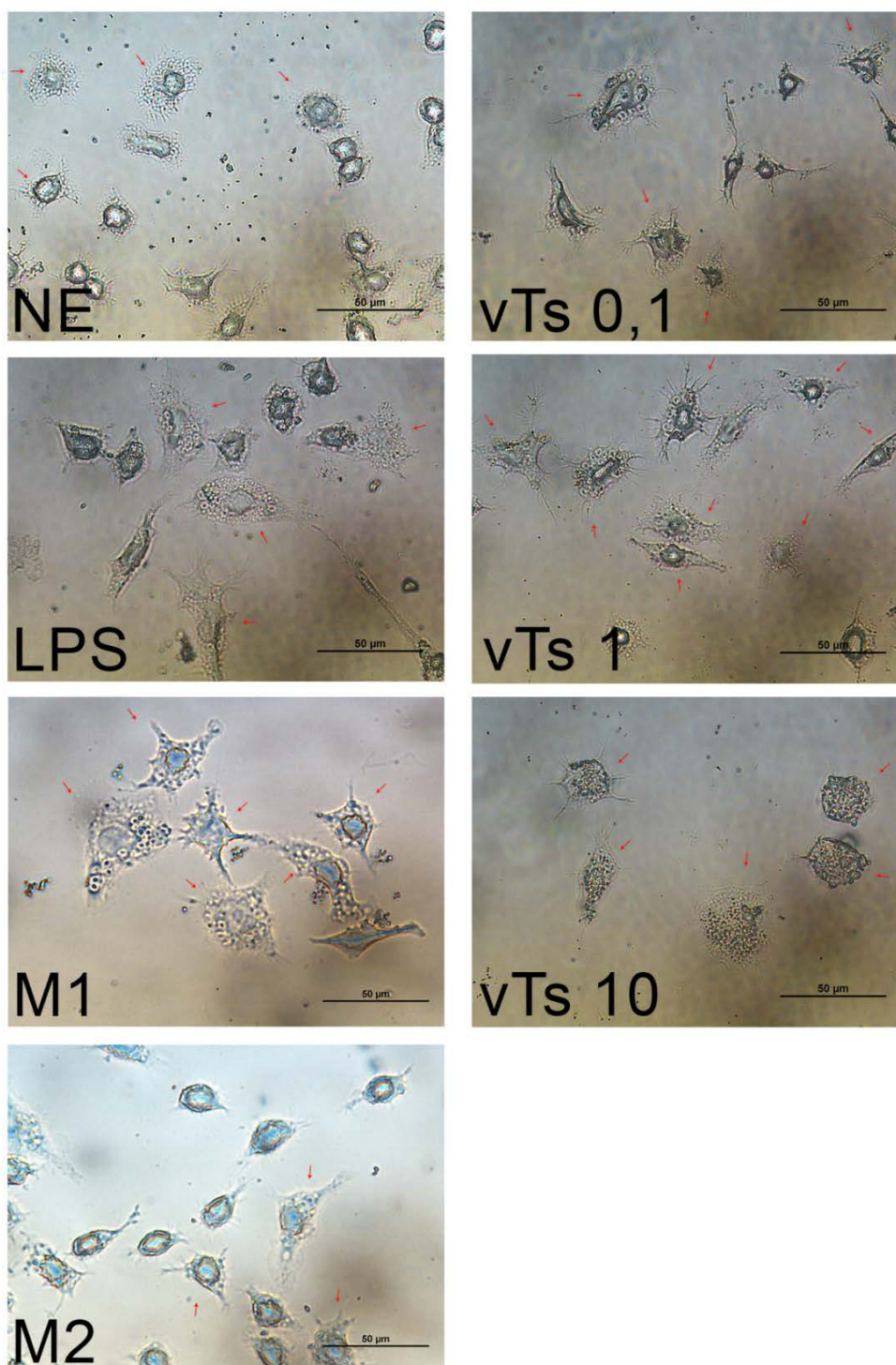


As células RAW 264.7 foram incubadas, por 24h, na presença ou ausência de veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 $\mu\text{g/mL}$) (barras brancas), ou Triton X-100 (1%) (barra preta), como controle positivo indutor de morte (lise) celular. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os resultados expressam a porcentagem média de viabilidade celular $\pm$ erro padrão ($n = 2$ experimentos, em triplicata). * para $p < 0,05$, em teste de Mann-Whitney, comparado ao grupo controle não estimulado.

5.2 vTs aumenta a atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7

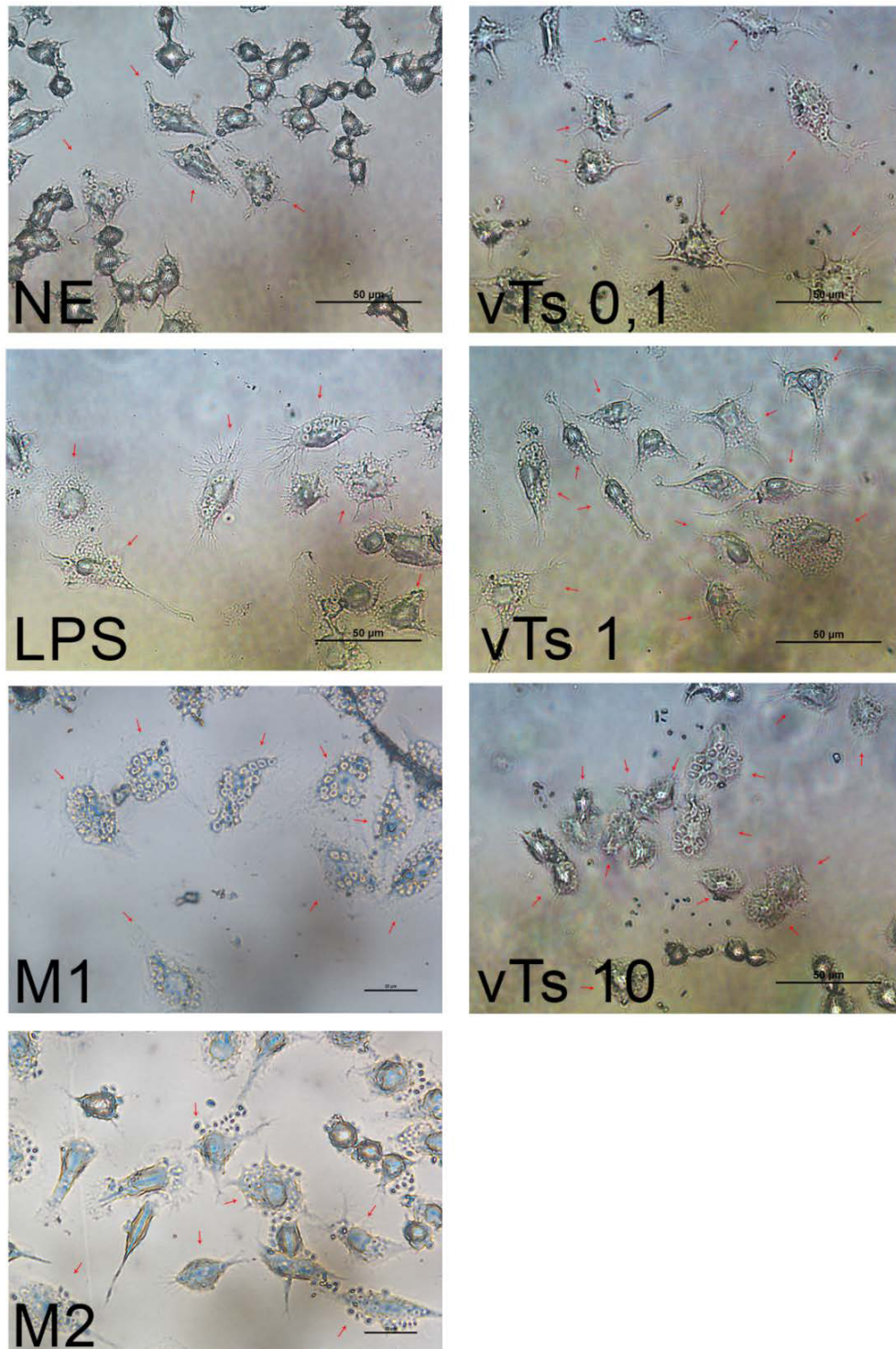
Inicialmente, avaliamos o potencial fagocítico das células RAW 264.7, uma vez que essa ação constitui importante, e a mais conhecida, característica funcional dos macrófagos. Para estes experimentos de fagocitose, utilizamos dois modelos, um baseado em partículas de Zymosan e um segundo com bactérias *E. coli*-GFP. O tratamento somente com vTs (0,1, 1,0, e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) aumentou a fagocitose de Zymosan por células RAW, após 24 ou 48 horas de tratamento (Figuras 6, 7 e 8).

Figura 6 – Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs por 24 horas, em presença de partículas de Zymosan



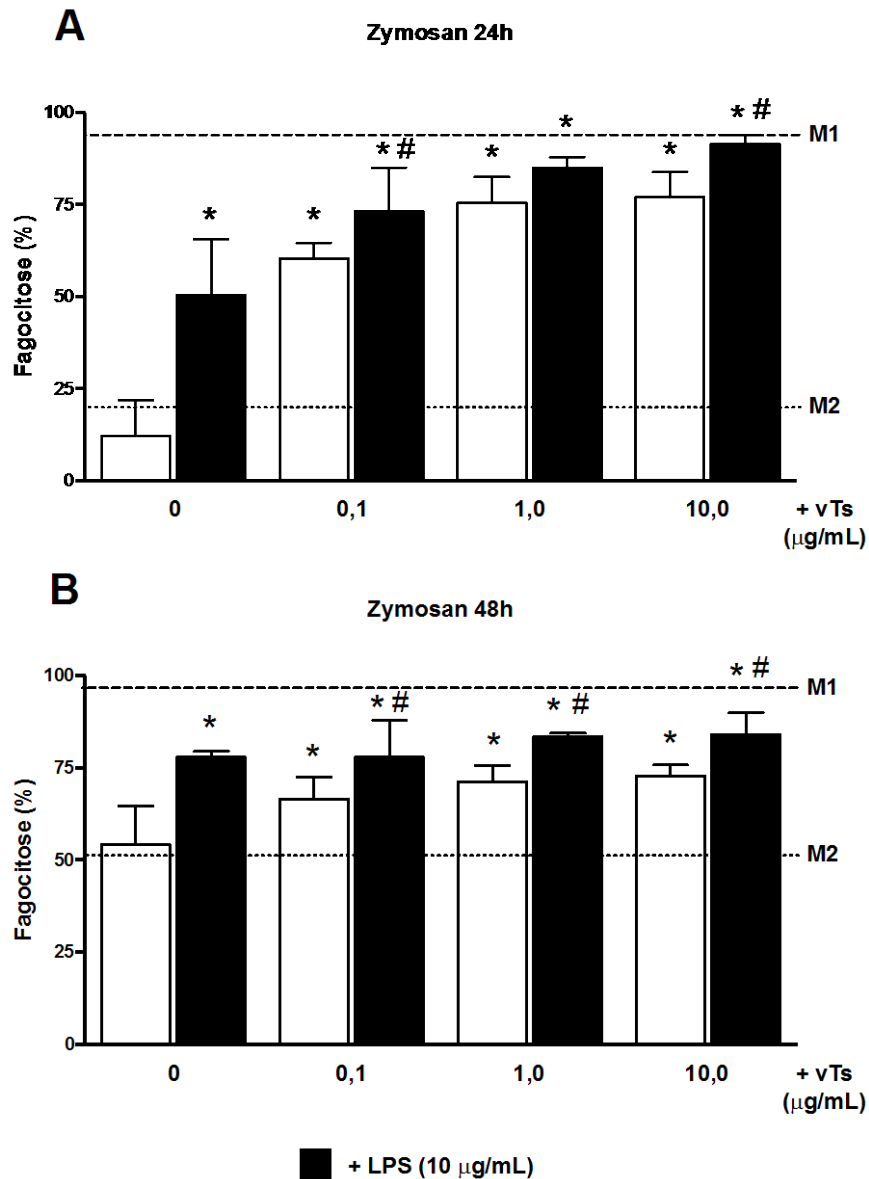
Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL), por 24 horas. Para comparação, as células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com Zymosan (10:1), por uma hora. Setas vermelhas indicando células que fagocitaram. As imagens para análise foram obtidas em microscópio óptico invertido (Nikon), em campo claro, utilizando a técnica de contraste de fase, em um aumento de 600x.

Figura 7 – Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs por 48 horas, em presença de partículas de Zymosan



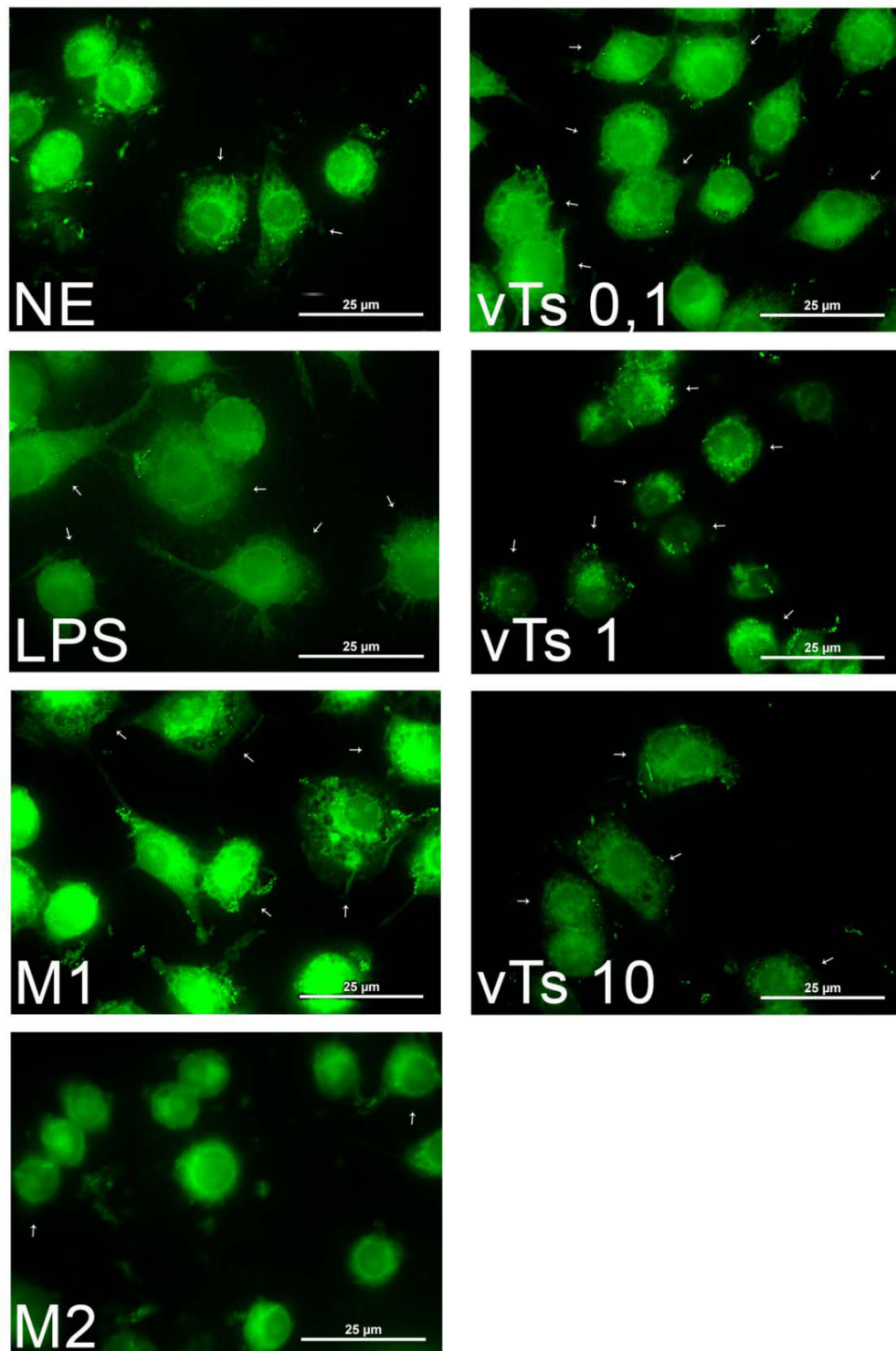
Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL), por 48 horas. Para comparação, as células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com Zymosan (10:1), por uma hora. Setas vermelhas indicando células que fagocitaram. As imagens para análise foram obtidas em microscópio óptico invertido (Nikon), em campo claro, utilizando a técnica de contraste de fase, em um aumento de 600x.

Figura 8 – Tratamento *in vitro* com vTs aumenta a fagocitose de Zymosan por macrófagos murinos de linhagem.



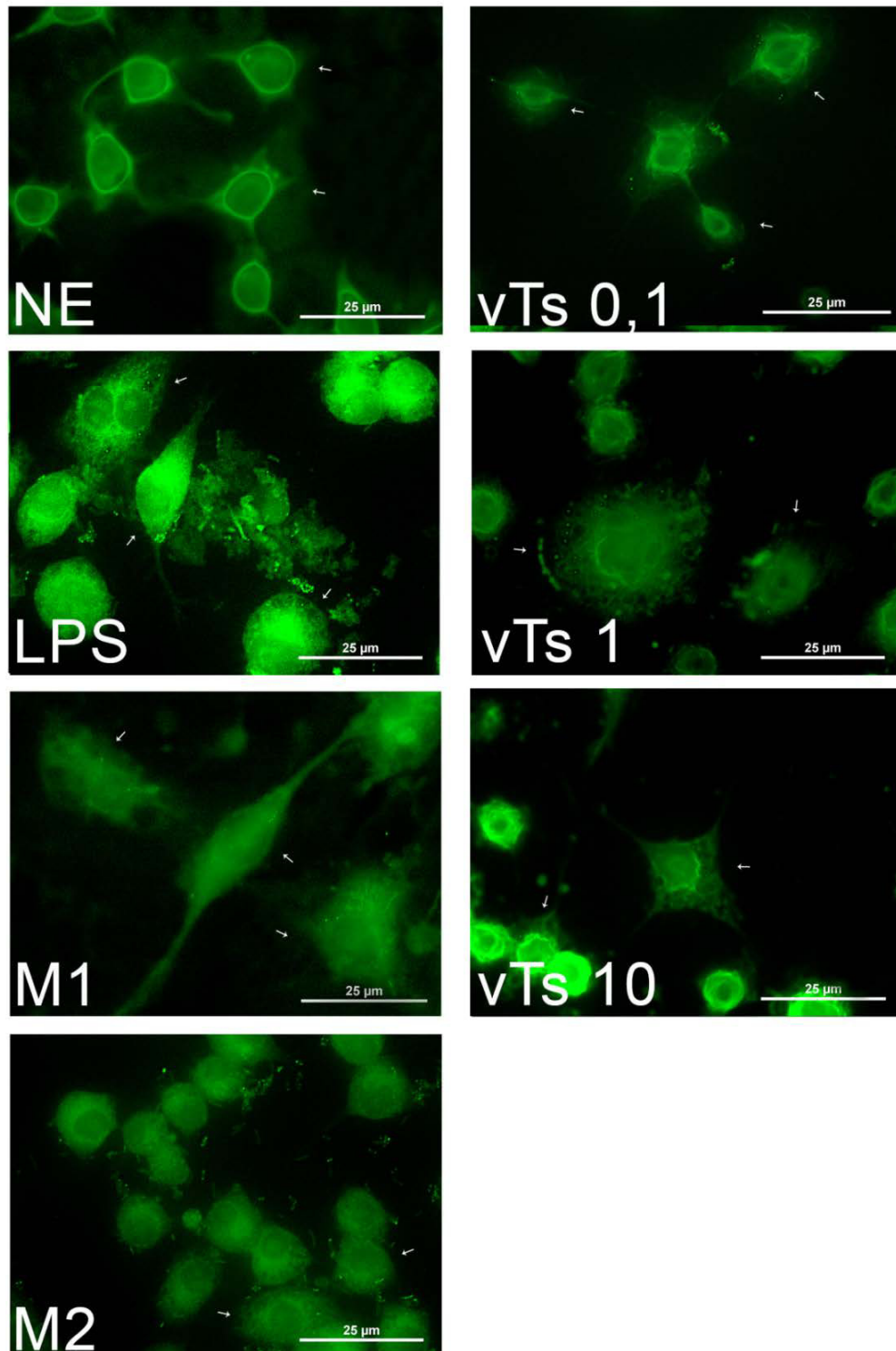
Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL), isoladamente (barras brancas) ou em associação com LPS (10 µg/mL) (barras pretas), por 24 (A) ou 48 (B). Para comparação, as células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com Zymosan (10:1), por uma hora. As imagens para análise foram obtidas em microscópio óptico invertido (Nikon), em campo claro, utilizando a técnica de contraste de fase, em um aumento de 600x. Os resultados expressam a porcentagem média de fagocitose $\pm$ erro padrão ($n = 3$ experimentos, em triplicata). * para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle não estimulado; # para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle estimulado apenas com veneno, sem LPS.

Figura 9 – Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs 24 horas, em presença de *E. coli*.



Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 $\mu\text{g/mL}$) ou LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), por 24 horas. Para comparação, as células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com *E. coli* expressando GFP (10:1), por uma hora. Setas brancas indicando macrófagos que fagocitaram. As imagens para análise foram obtidas em microscópio óptico invertido (Nikon), em campo escuro, utilizando a técnica de captação de fluorescência, em um aumento de 1000X.

Figura 10 – Atividade fagocítica de macrófagos murinos de linhagem tratados com vTs 48 horas, em presença de partículas de *E. coli*.



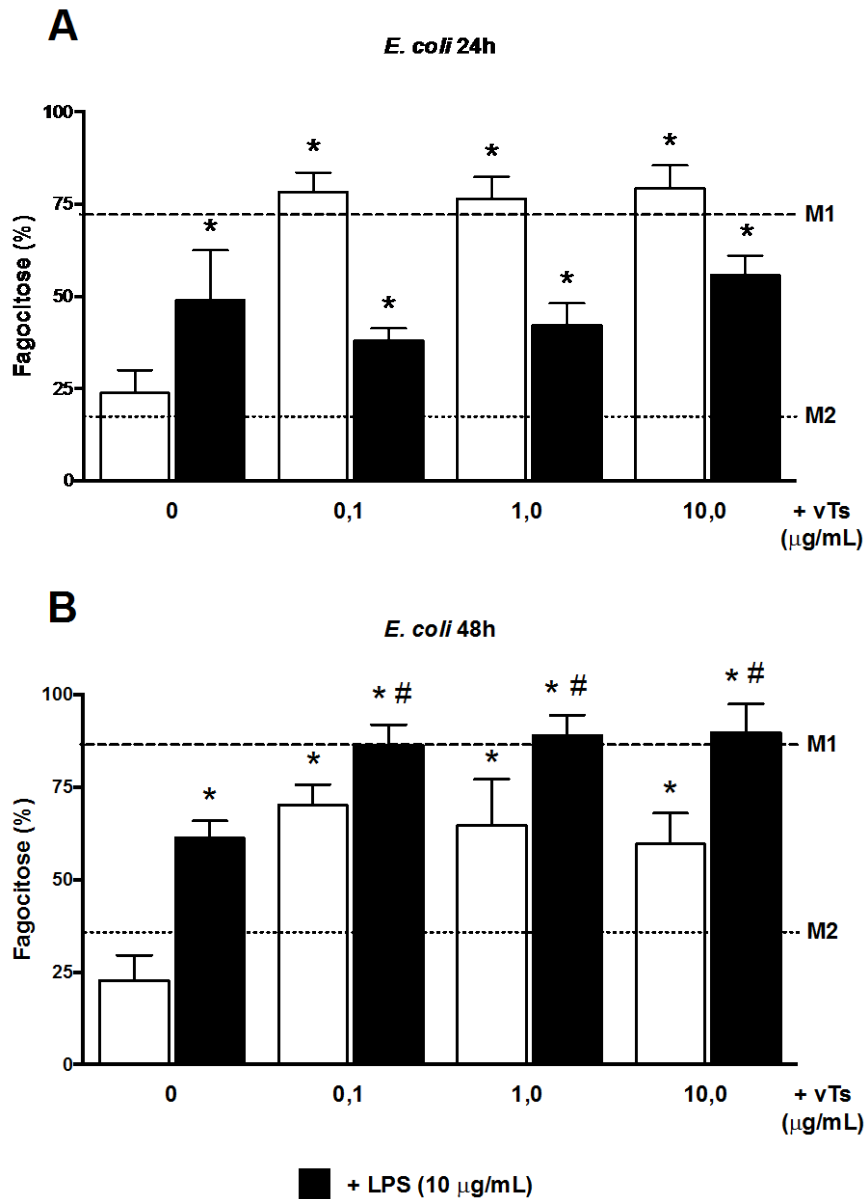
Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 $\mu\text{g/mL}$) ou LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), por 24 horas. Para comparação, as células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com *E. coli* expressando GFP (10:1), por uma hora. Setas brancas indicando macrófagos que fagocitaram. As imagens para análise foram obtidas em microscópio óptico invertido (Nikon), em campo escuro, utilizando a técnica de captação de fluorescência, em um aumento de 1000X.

Observando o aumento da porcentagem de fagocitose induzida diretamente pelo veneno, fizemos a estimulação das células RAW 264.7 de forma conjunta entre veneno e LPS. Obtivemos resultados significativos, evidenciando uma ação sinérgica do veneno junto ao LPS, que aumentou a atividade fagocítica quando comparado aos grupos estimulados apenas com o veneno, especialmente nas concentrações de 0,1 e 10,0 µg/mL em 24h (Figura 8 A), e para as três concentrações em 48h (Figura 8 B).

Em nosso segundo modelo de ensaio fagocítico, procedemos a análise desse parâmetro utilizando bactérias *Escherichia coli*. Para um ensaio de maior sensibilidade e melhor visualização para contagem, utilizamos microrganismos transfectados com vetor para expressão de GFP (*green fluorescent protein*) (Figura 9 e 10). Nossos dados mostram que, assim como para as partículas de Zymosan, o tratamento com vTs, aumentou significativamente o potencial fagocítico das células RAW 264.7 em relação ao englobamento das *E. coli* (Figuras 9, 10 e 11). A ação do veneno foi verificada em ambos os tempos de estimulação, de 24 e 48 horas (Figuras 11 A e B, respectivamente). Em ambos os tempos houve aumento da resposta. No entanto, diferente do ocorrido com as partículas de Zymosan, a fagocitose nos grupostratados em conjunto, por 24 horas, foi menos expressiva que o tratamento somente com o veneno (Figura 11 A). Ainda assim, estes grupos apresentaram diferença significativa do grupo não estimulado (Figura 11 A).

A fagocitose nos grupos tratados com veneno não foi diferente daquelas observadas em células polarizadas para o perfil M1 (Figura 8 e 11). Essa semelhança foi mais evidente nos grupos tratados com veneno e LPS. É importante ressaltar que houve um aumento significativo de atividade fagocítica, em todos os grupos tratados com veneno, em comparação com a resposta de células polarizadas para o perfil M2.

Figura 11 – Tratamento *in vitro* com vTs aumenta a fagocitose de *E. coli* por macrófagos murinos de linhagem.

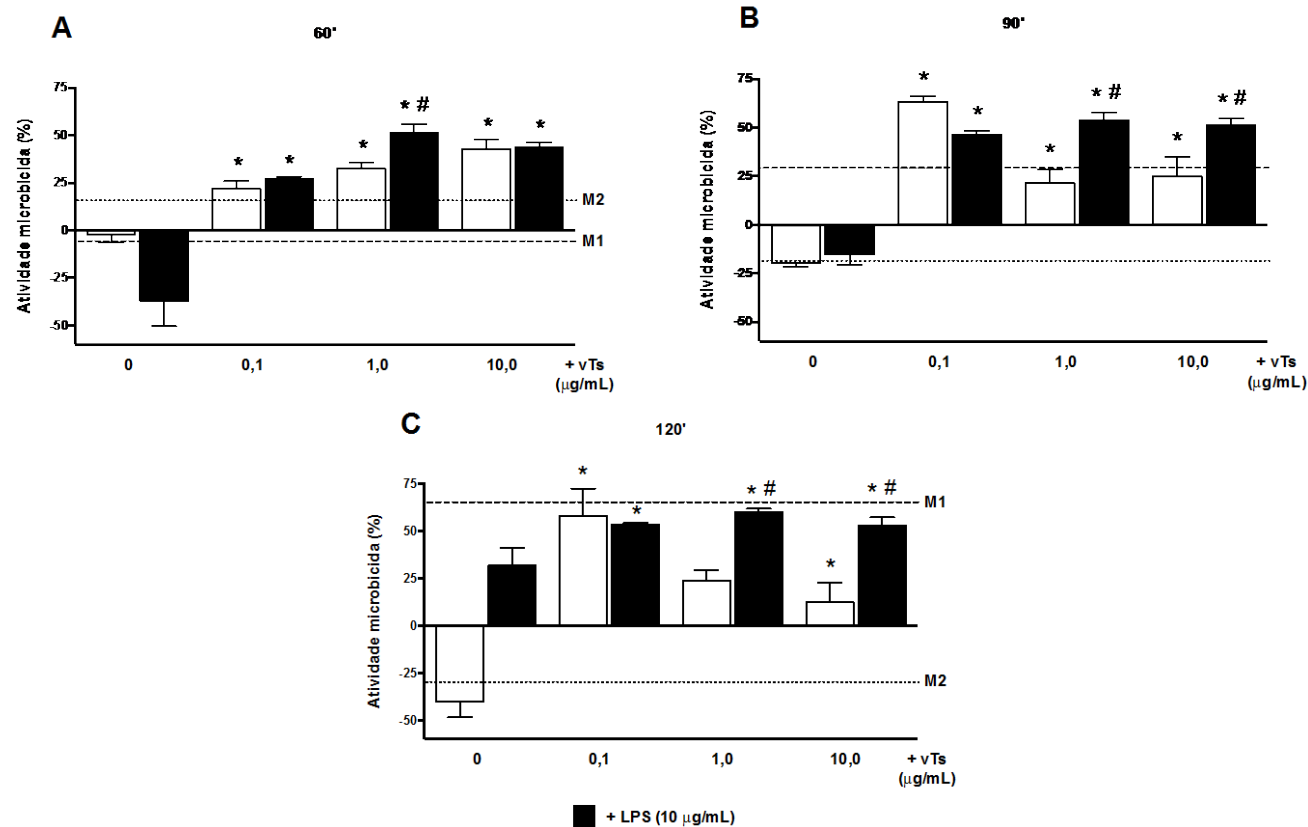


Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL), isoladamente (barras brancas) ou em associação (barras pretas), por 24 (A) ou 48 (B). Ainda, as células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com *E. coli* expressando GFP (10:1), por trinta minutos. As imagens para análise foram obtidas em microscópio óptico invertido (Nikon), em campo escuro, utilizando a técnica de captação de fluorescência, em um aumento de 1000X. Os resultados expressam a porcentagem média de fagocitose $\pm$ erro padrão ($n = 3$ experimentos, em triplicata). * para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle não estimulado; # para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle estimulado apenas com veneno, sem LPS.

5.3 vTs aumenta a atividade microbica contra *E. coli*

Uma vez verificada a potencialização da fagocitose de *E. coli* por células tratadas com o veneno de *T. serrulatus*, avaliamos o potencial do mesmo tratamento sobre a atividade microbica de macrófagos RAW 264.7 em relação à essas bactérias. Nesse modelo, comprovamos a eficiência do tratamento com o vTs, de forma tempo-dependente, em potencializar a atividade microbica dos macrófagos (Figura 12). Quando levamos em consideração o tratamento somente com o veneno, a dose de 0,1 µg/mL foi significativamente mais efetiva, mantendo uma ativação progressiva nos tempos avaliados (60, 90, 120 minutos após a fagocitose de 30 minutos). As demais doses (1,0 e 10,0 µg/mL), mesmo mantendo aumento significativo em relação ao controle não tratado, reduziram sua resposta ao longo do tempo. Já os grupos tratados com veneno e LPS, em conjunto, também apresentaram ação microbica maior que os grupos não estimulados, controle positivo com LPS e de células polarizadas para o perfil M1.

Figura 12 – Tratamento *in vitro* com vTs aumenta o *killing* de *E. coli* por macrófagos murinos de linhagem.



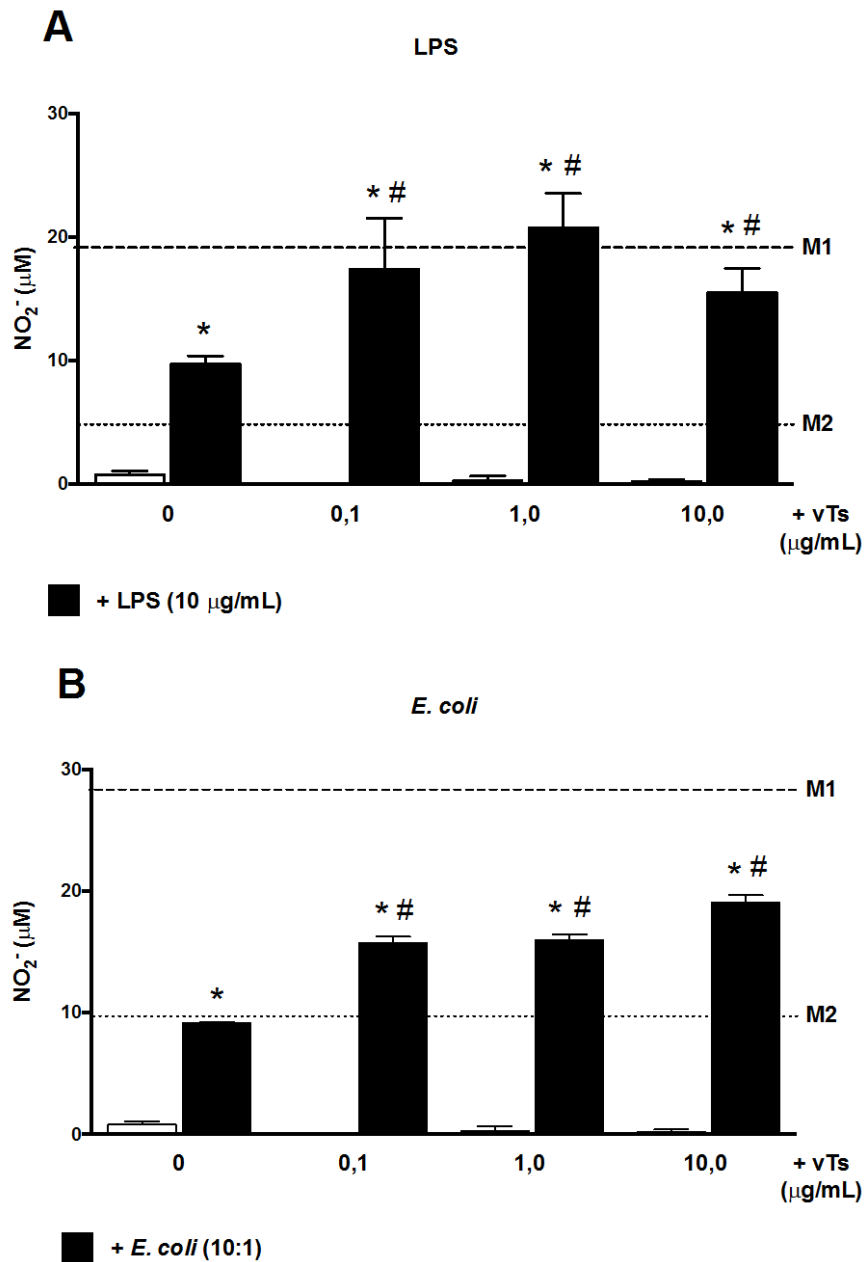
Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL), isoladamente (barras brancas) ou em associação (barras pretas), por 24 horas. Para comparação, as células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelo mesmo período de tempo. Após os tratamentos, as células foram incubadas com *E. coli* (cepa 352; proporção de 10:1), por 30, 60 (A), 90 (B) e 120 (C) minutos. A atividade microbicida foi avaliada pela contagem de CFU de bactérias recuperadas dos macrófagos. A contagem no tempo de 30 minutos foi considerada como tempo de fagocitose e, a partir deste, foi calculado o *killing* para os demais tempos. Os resultados expressam a porcentagem média de atividade microbicida $\pm$ erro padrão ($n = 3$ experimentos, em triplicata). * para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle não estimulado; # para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle estimulado apenas com veneno, sem LPS.

5.4 Produção de óxido nítrico pós-tratamento com vTs

Nossos dados mostram que, apesar da acentuação da atividade fagocítica e microbicida, o tratamento com veneno, por si, não induziu um aumento significativo na produção de óxido nítrico (Figura 13). No entanto, para o tratamento com vTs em conjunto com LPS (Figura 13 A) ou *E. coli* (Figura 13 B) os níveis de NO foram significativamente mais altos, quando comparados aos dos grupos não tratados ou tratados somente com LPS ou *E. coli*.

É importante salientar que a estimulação com o veneno, em conjunto com o LPS ou *E. coli*, induziu uma produção de NO acima da observada nas células polarizadas para o perfil M2. Ainda, o tratamento concomitante, veneno/LPS, induziu níveis de NO semelhantes ou maiores que os apresentados pelas células polarizadas para o perfil M1 (Figura 13 A).

Figura 13: Avaliação da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos de linhagem.

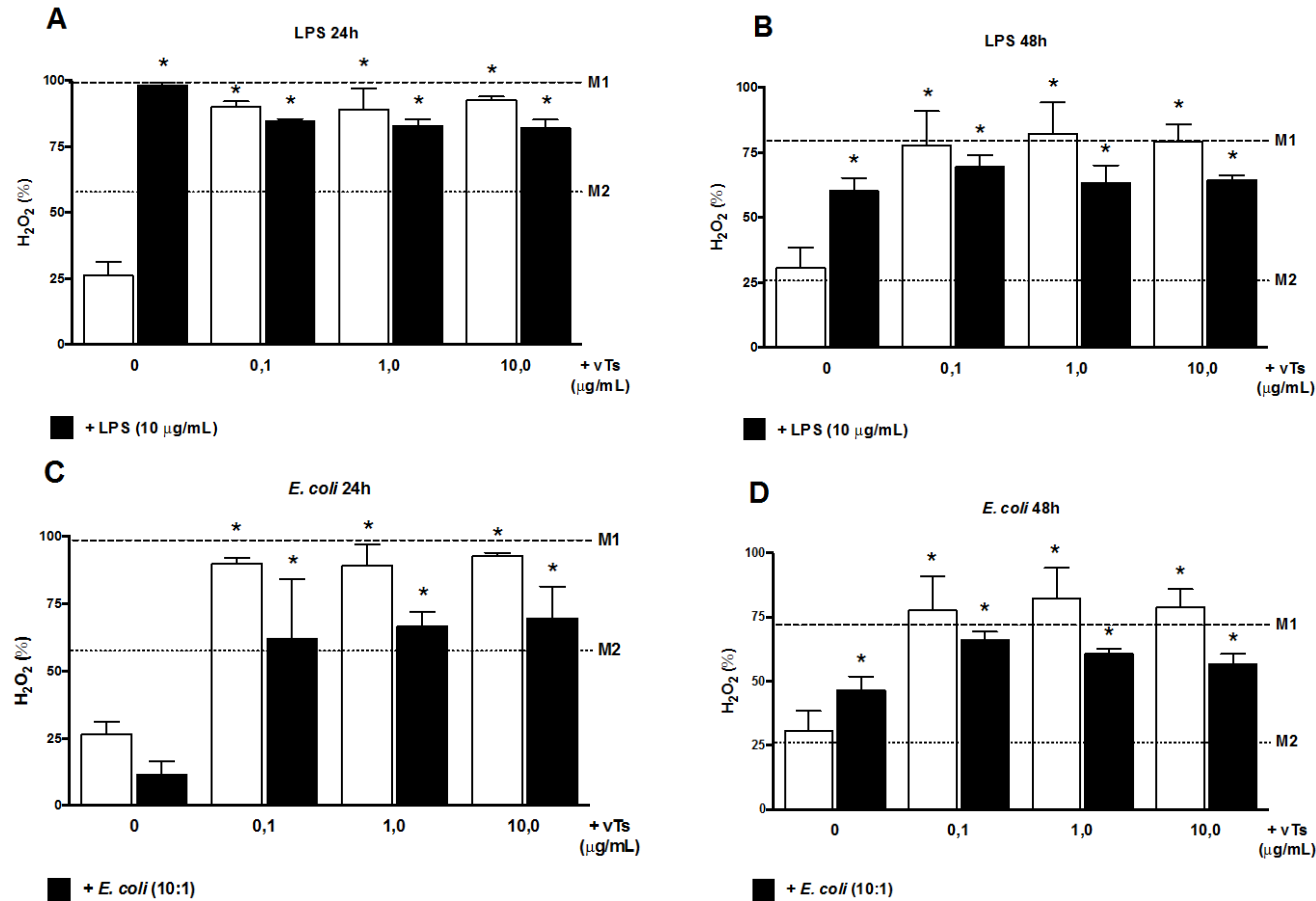


Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram incubadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL) (A) ou *E. coli* (cepa 352; 10:1) (B), isoladamente (barras brancas) ou em associação (barras pretas), por 48 horas. Para comparação, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelo mesmo período de tempo. Após os tratamentos, 50µL de sobrenadante das culturas foram retirados para avaliação da produção de NO₂⁻ por ensaio colorimétrico de Griess. Os resultados expressam a média de nitritos $\pm$ erro padrão (n = 3 experimentos, em triplicata). * para p<0,05, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle não estimulado; # para p<0,05, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle estimulado apenas com veneno, sem LPS ou *E. coli*.

5.5 vTs aumenta a produção de peróxido de hidrogênio

Uma vez que não observamos a ação isolada do veneno sobre a produção de NO, mas apenas em conjunto com o LPS, buscamos avaliar a produção de outra espécie reativa importante para as respostas microbidas, o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). O tratamento com veneno, por si, foi capaz de induzir a produção de H_2O_2 , apresentando valores significantes nas três concentrações utilizadas, tanto para 24 (Figuras 14 A e C) como 48 (Figuras 14 B e D) horas. O tratamento conjunto com LPS (Figuras 14 A e B) ou *E. coli* (Figuras 14 C e D) também induziu a produção de H_2O_2 , aumentando estes reativos em relação ao controle não estimulado. No entanto, o tratamento concomitante, apresentou menor resposta oxidativa, quando comparado aos grupos estimulados somente com veneno, mesmo esta redução não sendo estatisticamente significativa. Ainda, o tratamento somente com veneno, induziu uma resposta de *burst* oxidativo semelhante à observada nas células RAW 264.7 polarizadas para o perfil M1, em 24 (Figuras 14 A e C) ou 48 (Figuras 14 B e D) horas.

Figura 14 – Tratamento com vTs aumenta a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos murinos.



Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram incubadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) ou LPS (10 µg/mL) (A, B) ou *E. coli* (cepa 352; 10:1) (C, D), isoladamente (barras brancas) ou em associação (barras pretas), por 24 (A, C) ou 48 horas (B, D). Para comparação, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelo mesmo período de tempo. Após os tratamentos, foi adicionado DHR (375 ng/mL) aos poços da placa para procedermos com análise da produção de H_2O_2 no citômetro de fluxo. Os resultados expressam a média do percentual de células positivas para DHR $\pm$ erro padrão (n = 3 experimentos, em triplicata). * para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle não estimulado.

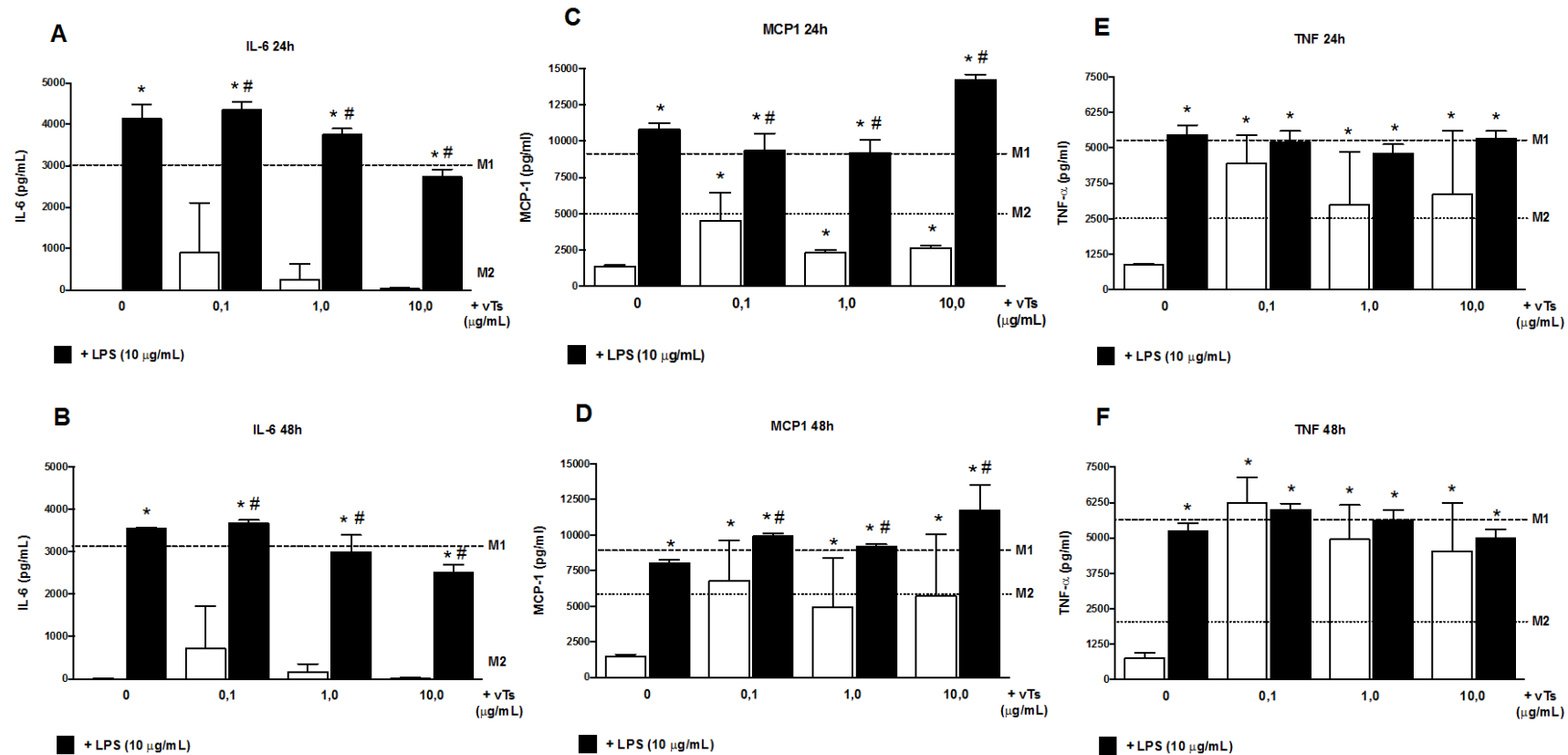
5.6 Tratamento com vTs induz a produção de IL-6, MCP-1 e TNF- α

A avaliação do perfil de citocinas produzido pelos macrófagos estimulados com o veneno demonstrou que o tratamento, por si, não induziu a produção significativa de IL-6. No entanto, este aumento foi observado nos grupos estimulados com veneno e LPS, em conjunto, quando comparados ao controle não estimulado e ao tratamento somente com veneno, no dois tempos de estudo (Figuras 15 A e 15 B). Ainda, os níveis de IL-6 induzidos pelo vTs foram semelhantes aos das células RAW 264.7 polarizadas para o perfil M1.

Diferente da IL-6, a liberação de MCP-1 por macrófagos tratados somente com vTs aumentou significativamente, nos tempos de 24 (Figura 15 C) e 48 (Figura 15 D) horas, em relação ao grupo não estimulado. É possível observar que o veneno, por si só, induz um aumento na liberação de MCP-1 no tempo de 48 horas comparado ao tempo de 24 horas. Os grupos com tratamento conjunto também apresentam aumento na produção de MCP-1. Em 24 horas de tratamento, apenas o grupo concomitante, LPS mais vts a 10 $\mu\text{g/mL}$, apresentou diferença significativa do grupo tratado somente com a mesma concentração veneno (Figura 15 C). Já no tempo de 48 horas todos os grupos de tratamento conjunto apresentaram diferença estatística em relação aos grupos tratados apenas com veneno (Figura 15 D). Esta ativação foi a mais significativa, mesmo quando comparada à produção de MCP-1 por células RAW 264.7 polarizadas para o perfil de macrófagos M1.

O veneno, por si, também foi capaz de induzir a produção de TNF- α , sendo observado uma cinética positiva em relação aos tempos de 24 (Figura 15 E) e 48 (Figura 15 F) horas, quando comparados ao grupo não estimulado. Um padrão semelhante de aumento foi observado para os grupos de tratamento conjunto. Com 48 horas de incubação o grupo tratado com veneno na concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e o grupo tratado com LPS associado ao veneno na concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram níveis mais altos que o próprio LPS (Figura 15 F). Do mesmo modo que para a MCP-1, os níveis de TNF- α induzidos pelo vTs foram semelhantes aos secretados por células RAW 264.7 polarizadas para o perfil M1.

Figura 15: O tratamento com vTs aumentou a produção de IL-6, MCP-1 e TNF- α por macrófagos murinos.



Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 μ g/mL) ou LPS (10 μ g/mL), isoladamente (barras brancas) ou em associação (barras pretas), por 24 (A, C, E) ou 48 horas (B, D, F). Ainda, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, os sobrenadantes das culturas foram retirados para avaliação da produção de IL-6 (A, B), MCP-1 (C, D) e TNF- α (E, F) por citometria de fluxo com o *kit inflammation CBA*. Os resultados expressam a média da concentração de citocina (pg/mL) $\pm$ erro padrão (n = 2 experimentos, em triplicata) de citocinas. * para p<0,05, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle não estimulado; # para p<0,05, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle estimulado apenas com veneno, sem LPS ou *E. coli*.

Além das citocinas IL-6, MCP-1 e TNF- α , em relação às demais citocinas avaliadas pelo kit *inflammation* (BD Biosciences), observamos o aumento somente na produção de IL-12p70. Esse aumento foi visto nas células estimuladas com veneno associado à incubação com *E. coli*, por 48 horas (APÊNDICE B). As células tratadas com o veneno (0,1, 1,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$), co-incubadas com *E. coli*, foram capazes de produzir significativamente mais IL-12p70, em comparação a todos os outros grupos.

5. 7 Expressão de CD80, CD86 e iNOS em células RAW 264.7 tratadas com vTs

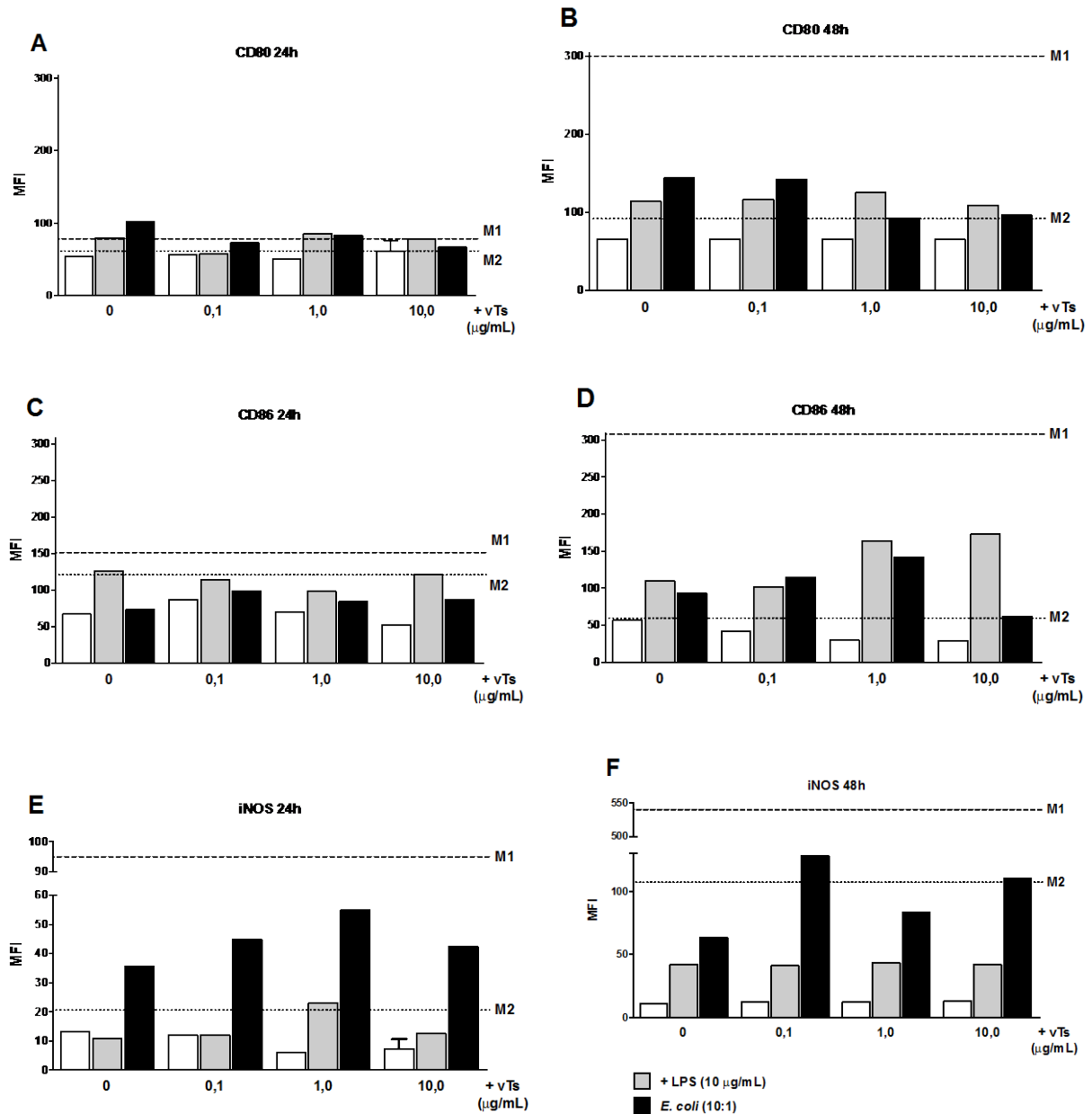
Alterações no perfil de resposta microbicida dos macrófagos, bem como na produção de citocinas, podem estar relacionadas à mudanças na expressão de marcadores de superfície e enzimas citoplasmáticas. Nesse sentido, avaliamos por citometria de fluxo os marcadores de superfície CD80 e CD86, além da expressão da enzima iNOS (Figura 16), marcadores também utilizados para a definição do perfil de polarização dos macrófagos.

Para CD80 (APÊNDICE C) não foram observadas alterações significativas na expressão da molécula em quaisquer dos tratamentos (Figuras 16 A e 16 B). O aumento na intensidade de fluorescência (MFI), nos grupos tratados com veneno por 48 horas, em conjunto com LPS ou *E. coli*, foi discreto em relação aos grupos tratados apenas com veneno e menor que os estimulados somente com LPS ou *E. coli* (Figura 16 B).

Em relação à molécula CD86 (APÊNDICE D) nos macrófagos RAW 264.7, é possível perceber um aumento da expressão desse marcador nos grupos tratados com veneno em associação com LPS ou *E. coli*, principalmente em 48 horas e na dose de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de veneno (Figura 16 D). Nesse tempo e tratamento citado, diferente do que ocorreu para o CD80, percebemos uma expressão maior que a observada para o perfil M2, mesmo sendo menor que a observada para o perfil M1 de polarização.

Já os resultados para iNOS (APÊNDICE E) confirmaram os valores expressos na produção de NO. Assim como o veneno, por si, não foi capaz de produzir valores expressivos de óxido nítrico, a expressão de iNOS em células tratadas somente com o vTs encontrava-se igual às células do controle não estimulado. No entanto, as estimulações com o veneno (em todas as concentrações) associadas à incubação com *E. coli*, por 24 ou 48 horas, apresentaram maior expressão de iNOS (Figuras 16 E e 16 F). Essa expressão, mesmo abaixo do apresentando pelas células polarizadas para o perfil M1, foi maior do que em macrófagos polarizados para o perfil M2, ratificando o potencial do veneno.

Figura 16 – vTs aumenta a expressão de iNOS em macrófagos murinos em presença de *E. coli*.



Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 μg/mL) ou LPS (10 μg/mL) ou *E. coli* (cepa 352; 10:1), isoladamente (barras brancas) ou em associação (barras cinzas para LPS e pretas para *E. coli*), por 24 (A, C, E) ou 48 horas (B, D, F). Para comparação, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN-γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelos mesmos períodos de tempo. Após tratamento, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para avaliação da expressão de CD80 (A, B), CD86 (C, D) ou iNOS (E, F) por citometria de fluxo. Os resultados expressam os valores de intensidade de fluorescência (MFI).



No decorrer desta pesquisa, avaliamos os efeitos do tratamento de macrófagos com veneno de *Tityus serrulatus* (vTs). Nesse sentido, buscamos também aumentar o conhecimento sobre as funções e respostas destes fagócitos mononucleares. De uma forma geral, o vTs administrado *in vitro*, por 24 ou 48 horas, em concentrações de 0,1, 1,0 e 10 µg/mL, aumentou a fagocitose, a atividade microbicida, o *burst* oxidativo, a produção de citocinas, como IL-6 e MCP-1, além da expressão de CD86 e iNOS. Estas são algumas das evidências encontradas no presente trabalho, que confirmam o potencial do veneno de *T. serrulatus* para ativação de macrófagos e direcionamento de sua polarização para o perfil M1 de resposta.

Muitos bioprodutos apresentam efeitos terapêuticos importantes em seu contexto de uso, mas o risco de manifestações adversas não deve ser descartado (BASCONES-MARTINEZ *et al.*, 2014). Em modelos de cultura de células e tratamento *in vitro* uma relevante “manifestação adversa” a ser considerada é a potencial citotoxicidade do estímulo empregado (WEYERMANN *et al.*, 2005). Dessa forma, testamos se as concentrações de uso do vTs apresentariam efeito citotóxico em relação aos macrófagos. Nesse sentido, nenhuma das concentrações empregadas no presente trabalho interferiu na viabilidade das células RAW 264.7.

Esses resultados tornam-se ainda mais importantes, pois utilizamos o veneno bruto em nossos ensaios, e não uma de suas frações. Dessa forma, não foram excluídos de nosso tratamento quaisquer componentes potencialmente citotóxicos presentes no veneno. A avaliação da viabilidade, após a estimulação, mostra que as doses utilizadas não induziram a morte de células RAW 264.7. Dessa forma, os demais resultados observados e analisados não foram afetados por uma eventual diminuição no número de células avaliadas, sendo estes relativos ao efeito real do tratamento.

Após a análise de citotoxicidade, procedemos a avaliação das funções dos macrófagos tratados com o veneno. Nossos resultados demonstraram que o veneno do escorpião *T. serrulatus* potencializou a atividade fagocítica nos macrófagos RAW 264.7, tanto para Zymosan como para *E. coli*. A fagocitose constitui a primeira ação dos macrófagos após a interação entre estes e os patógenos (MCGRATH *et al.*,

2015). Alterações na atividade fagocítica implicam em mudanças de expressão de moléculas de superfície, bem como em modificações morfológicas destas células. Petricevich *et al* (2008) mostraram que fração purificada do veneno ou a toxina Ts1 pura apresentaram ação estimuladora em relação à fagocitose por macrófagos murinos. Estes resultados corroboram com os encontrados em nossas análises.

A avaliação da fagocitose de partículas de Zymosan, oriundas da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, é um ensaio clássico para caracterização da função dessas células. Esta resposta pode estar relacionada com um possível aumento da expressão dos receptores TLR2 (*Toll-like receptor 2*) e/ou Dectina-1. Esses são envolvidos diretamente com o reconhecimento do Zymosan e sua fagocitose (HORSTHEMKE *et al*, 2017). Uma vez que observamos o aumento dessa resposta, em um ensaio modelo, avaliamos a resposta fagocítica dos macrófagos tratados frente a um microrganismo competente. Nesse contexto, procedemos à análise da fagocitose de bactérias *Escherichia coli* 352.

A *E. coli* é uma bactéria classificada como Gram negativa, ou seja, apresenta endotoxinas, especificamente lipopolissacarídeo (LPS), na estrutura de sua parede celular (REN *et al.*, 2016). Esse aumento da fagocitose, induzido pelo tratamento com vTs, pode estar relacionado com uma maior expressão de TLR4 (*Toll-like receptor 4*) na superfície dos macrófagos, uma vez que o LPS é seu agonista (KAWAI; AKIRA, 2010). Este receptor e o TLR2 apresentam vias de sinalização importantes para indução das alterações morfológicas que envolvem o aumento e redistribuição de f-actina, contribuindo diretamente com a potencialização da atividade fagocítica (BORÁN *et al*, 2008).

Recentemente, Zoccal *et al* (2014) demonstraram que macrófagos estimulados com vTs apresentaram níveis aumentados da expressão dos genes *Tlr2*, *Cd14*, *Myd88* e *Ptgs2*, sem afetar os níveis de expressão de *Tlr4*. Esses dados dão respaldo, em termos de mecanismos moleculares, aos nossos dados funcionais de fagocitose. Podemos, desse modo, reforçar nossa sugestão do aumento da fagocitose pela maior expressão de TLR2 e CD14, este último também envolvido no reconhecimento de LPS (KAWAI; AKIRA, 2010).

Ainda, ressaltamos que, quando comparados aos controles de polarização dos macrófagos para o perfil M1 ou M2, os tratamentos com veneno de escorpião mostraram um padrão muito semelhante ao perfil M1 de resposta. Este perfil de polarização está relacionado à ação citotóxica clássica dos macrófagos, no que diz respeito a maior fagocitose, produção de produtos potencialmente microbicidas e, conseqüente, *killing* de patógenos (MARTINEZ; GORDON, 2014). De forma evidente, os macrófagos estimulados com vTs e os macrófagos M1 não somente demonstraram uma atividade fagocítica semelhante, como também apresentaram-se morfológicamente similares.

Em estudo recente, Li *et al* (2016) demonstraram que macrófagos M1 adotam uma morfologia celular alongada, em forma de fuso e membranas mais espreiadas, enquanto que macrófagos M2 apresentaram forma arredondada e achatada. Em nossos achados observamos que os macrófagos estimulados com o veneno apresentaram perfil equivalente ao M1. Dentre essas alterações morfológicas evidenciamos a presença de maior número de projeções da membrana (pseudópodes), formas alongadas, maior espreiamento e tamanho maior que as células do perfil M2 (Figura 6, 7, 9 e 10). Desse modo, nossos experimentos de resposta fagocítica já nos dão indícios de uma potencial polarização dos macrófagos tratados com veneno para um perfil M1 de resposta.

Ao observarmos o aumento do potencial de fagocitose induzido pelo veneno, partimos para a avaliação da atividade microbicida. Neste quesito, a estimulação com o veneno levou à maior eliminação de *E. coli* em todos os tempos de avaliação (60, 90 e 120 minutos). Ainda, o tratamento com vTs concomitante a estimulação com LPS mostrou ação sinérgica, potencializando a atividade microbicida das células incubadas nessas condições. Também, observamos uma resposta de *killing* de *E. coli* por macrófagos tratados com veneno, em combinação ou não com LPS, igual ou significativamente maior que as dos macrófagos M1. Este dado corrobora ao anterior de fagocitose, no que diz respeito ao perfil de polarização de macrófagos induzido pelo tratamento com veneno.

Mesmo identificando um aumento significativo na atividade fagocítica, após o estímulo com o veneno, essa resposta por si não indica de forma definitiva a indução

dos mecanismos microbicidas. Nesse contexto, avaliamos a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, espécies reativas com importante função microbicida e inflamatória (NAUSEEF, 2007), após o tratamento com vTs. Essa análise nos permitiu avaliar um potencial mecanismo envolvido na resposta microbicida observada. Ainda, essas avaliações forneceram importante indício do padrão de polarização, M1 ou M2, que o tratamento com o veneno está induzindo.

Quando avaliamos a produção de óxido nítrico, não obtivemos resultados expressivos para os grupos de macrófagos estimulados somente com as doses do veneno. No entanto, as células estimuladas com veneno associado ao LPS ou *E. coli* apresentaram produção de NO significativamente maior que o grupo não estimulado e o próprio controle positivo (tratado somente com LPS). De forma ainda mais importante, a associação entre veneno e LPS induziu uma produção de NO de forma significativamente maior que o próprio grupo estimulado para o perfil M1.

Tendo a fagocitose como parâmetro de atividade microbicida, mesmo que indireto e não conclusivo, era esperado um aumento na resposta de produção de reativos de nitrogênio pelos macrófagos tratados somente com o veneno. Em estudo *in vitro* com frações do veneno de *T. serrulatus*, realizado por Zoccal *et al* (2011), foi demonstrado que as frações Ts1, Ts2 e Ts6 do veneno induziram a produção de NO, ainda que em baixa quantidade. Para nosso estudo, utilizamos o veneno bruto. É possível que algumas frações do veneno estejam inibindo a síntese de NO. Dessa forma, a ação conjunta à outro estímulo pode ser necessária para que haja produção efetiva de óxido nítrico.

A produção dos reativos de nitrogênio constituem uma característica importante para a descrição do perfil de polarização dos macrófagos. No entanto, a definição de um macrófago em estado M1 (citotóxico/pró-inflamatório) ou M2 (regulador/reparador tecidual) se dá, também, pela análise de outros parâmetros, como: perfil de citocinas produzidas; liberação de espécies reativas de oxigênio; atividade da arginase; e expressão quantitativa e qualitativa de proteínas de superfície celular (MILLS; LEY, 2014).

Assim, partimos para a avaliação de peróxido de hidrogênio, uma vez que o sistema NADPH oxidase/SOD (superóxido dismutase) também representa um importante mecanismo molecular gerador de espécies reativas (de oxigênio) com alto potencial citotóxico e inflamatório (TAN *et al*, 2016). O tratamento com vTs aumentou significativamente o número de células produtoras de H₂O₂. A estimulação somente com o veneno, por 48 horas, gerou uma resposta oxidativa maior que a provocada pelo LPS ou mesmo a observada nos macrófagos M1. Mais uma vez o perfil de resposta induzido pelo vTs se mostrou direcionado para a polarização de macrófagos em um perfil M1.

Um aumento do *burst* oxidativo, com consequente produção de espécies reativas de oxigênio, é uma característica importante de macrófagos ativados (MILLS; LEY, 2014). O aumento no número percentual de células produtoras de H₂O₂ sugere a ativação das mesmas e aumento na expressão e/ou ativação dos componentes do sistema NADPH oxidase. Sabe-se, que este sistema pode ser iniciado pela ligação aos receptores de superfície celular de agonistas naturais, como fMLP (peptídeo microbiano) ou a anafilotoxina C5a, e mesmo pela ativação direta da proteína quinase C por agonistas sintéticos (JANG; IMLAY, 2011; LINLEY *et al*, 2012). Dessa forma, fica evidente que muitas vias de sinalização podem participar na atividade do veneno sobre esse sistema gerador de espécies reativas de oxigênio.

Recentemente, Xu *et al* (2016) mostraram que a deleção de NOX1 e NOX2, em macrófagos associados à tumores, levou a uma diminuição dramática na produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em baixa eficiência na diferenciação de monócitos para macrófagos, bem como na polarização de macrófagos para um perfil M2. Em outro modelo, de lesão de medula espinhal, Bermudez *et al* (2016) demonstraram que o pico de expressão de NOX2 foi associado com o declínio na polarização M2. No mesmo estudo, *in vitro*, a inibição de NOX2 deslocou a polarização microglial para o fenótipo M2. Estes resultados mostram que a expressão das isoformas de NOX é independente do estado de polarização, mas que a atividade de NOX pode influenciar a polarização subsequente. Dessa forma, o aumento na produção de H₂O₂ pelos macrófagos

estimulados com vTs constitui um forte indicativo da polarização destes para um perfil M1.

Não só os dados de *burst* oxidativo, mas os demais resultados até então discutidos nos dão um forte indício de que o vTs tende a polarizar os macrófagos RAW 264.7 para um perfil M1. No entanto, para definirmos esse perfil com maior segurança partimos para a avaliação das citocinas. Estas proteínas, produzidas pelas células do sistema imune, são um importante indicador do tipo e grau da resposta induzida por estímulos específicos (MARTINEZ *et al.*, 2011). A avaliação do perfil de citocinas produzido pelos macrófagos estimulados com o veneno demonstrou que o tratamento foi capaz de induzir a produção de IL-6, TNF- α e MCP-1.

Em estudos *in vivo* com o veneno de *T. serrulatus*, nosso grupo demonstrou seu efeito no recrutamento celular e aumento das citocinas inflamatórias no sangue (FIALHO *et al.*, 2011). Estes resultados corroboram os nossos achados *in vitro* e indicam uma forte relação com a via de produção do óxido nítrico e, principalmente, de peróxido de hidrogênio. No entanto, Maciel *et al* (2014) observaram níveis aumentados da citocina IL-10 em animais tratados profilaticamente com vTs subcutâneo, antes do estabelecimento de sepse por CLP. Ainda, nesse estudo, foi observado que o tratamento com vTs induziu proteção anti-inflamatória no modelo de sepse em questão.

Esses resultados mostram que, em diferentes modelos *in vivo*, a atuação de um mesmo estímulo varia de acordo com a via de administração, as doses empregadas e mesmo os desafios apresentados subsequentemente. Nosso estudo *in vitro* reduz as variáveis de um modelo complexo, envolvendo o Sistema Imunológico como um todo. Dessa forma, possibilita um maior esclarecimento dos efeitos diretos do veneno sobre os macrófagos (e.g. possíveis receptores, vias de sinalização e consequências efectoras, como polarização para M1 ou M2).

Em relação à IL-6 há um aumento aparente na produção desta citocina. As células tratadas somente com veneno aumentaram a produção em relação ao controle não estimulado. No entanto, essa produção foi significativamente menor

que a de células tratadas com LPS somente. Ainda, quando os macrófagos RAW 264.7 foram incubados com veneno e LPS, concomitantemente, houve uma redução dose-dependente (das concentrações de veneno) na produção de IL-6, quando comparado ao grupo estimulado somente com LPS. Desse modo, em relação aos resultados encontrados por Maciel *et al* (2014), sugere-se que, quando o Sistema Imunológico está iniciando a resposta (nosso modelo *in vitro*), o veneno é capaz de apresentar um efeito sinérgico ao LPS. No entanto, se o sistema já encontra-se fortemente estimulado (modelo de sepse por CLP), o veneno efetua um *feedback* negativo em relação à citocinas como a IL-6.

Por outro lado, o TNF- α e a MCP-1 encontravam-se em níveis elevados, estatisticamente semelhantes ou superiores aos controles positivo (LPS) e de macrófagos M1. O *feedback* negativo, observado para IL-6, não foi constatado para as outras citocinas. Ainda, macrófagos RAW 264.7 tratados com veneno associado ao LPS mostraram um aumento na produção de MCP-1 e TNF- α . Recentemente, Moore *et al* (2015), mostraram que, em modelo de resposta a corpo estranho, os macrófagos sofrem ativação complexa com características de M1 e M2, incluindo a indução de TNF- α e ativação de NF- κ B. Ainda, esses processos mostraram-se dependentes da produção de MCP-1. Dessa forma, o perfil da produção de citocinas apresentado pelos macrófagos estimulados com vTs corrobora com a ideia de polarização para um perfil M1, mesmo com características menos agressivas do ponto de vista inflamatório deletério.

Ainda, Zoccal *et al* (2014) demonstraram que o vTs é reconhecido por TLR2, TLR4 e CD14, ativando suas vias de sinalização, como AP-1 e NF- κ B. O fato do veneno “utilizar” o mesmo receptor que o LPS e a *E. coli*, estímulos e controles positivos no nosso trabalho, ajuda a entender seu efeito nas citocinas, bem como a ação sinérgica no aumento de outras respostas. Essas vias de sinalização ativadas pelo vTs estão envolvidas na alteração funcional dos macrófagos, como potencialização da fagocitose e aumento na produção de espécies reativas com potencial microbicida (CHEN; NUNEZ, 2010). Nesse contexto, os fatores de transcrição ativados pelo veneno de *T. serrulatus* (ZOCCAL *et al.*, 2014), NF- κ B e AP-1 são comuns e essenciais para expressão dos genes de IL-6 (INOUY *et al.*, 2007), MCP-1 (KUTLU *et al.*, 2003) e TNF- α (ELAHI *et al.*, 2009). Dessa forma,

nossos resultados do aumento da produção dessas citocinas é corroborado pelos dados da literatura e fortalecem a observação dos resultados de fagocitose, sugerindo que o tratamento com o veneno promove uma ativação “clássica”, perfil M1, dos macrófagos RAW 264.7.

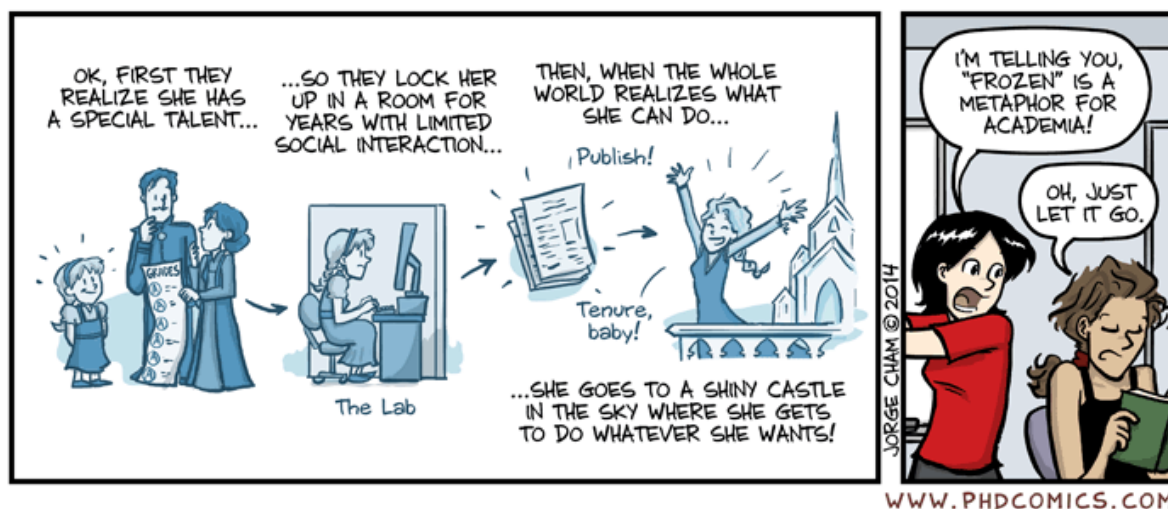
De forma tão importante quanto os aspectos funcionais, as variações fenotípicas, expressão diferenciada de moléculas de superfície, tem se mostrado essenciais para a caracterização da polarização dos macrófagos ativados (ITALIANI; BORASCHI, 2014). Para tentar definir de forma ainda mais clara o efeito ativador/polarizador do veneno de *T. serrulatus*, procedemos com a análise da imunofenotipagem. Mia *et al* (2014) demonstraram que macrófagos estimulados com LPS e INF- γ (padrão M1), expressaram níveis altos de CD86. Este padrão de expressão foi confirmado em nosso grupo controle de polarização M1. Em nossos achados, o tratamento dos macrófagos somente com o veneno não alterou a expressão de CD86 de forma significativa. No entanto, as células estimuladas com veneno em associação ao LPS ou *E. coli* apresentaram maiores níveis desse marcador, quando comparados ao controle não estimulado. Essa expressão foi menor que em macrófagos M1, mas superior, pelo menos em duas vezes, à expressão observada em macrófagos M2. Esses resultados indicam a polarização para um perfil M1, com um aspecto intermediário, como já reportado em modelos de inflamações crônicas (VOGEL *et al.*, 2013)

Além do CD86, avaliamos a expressão intracelular da enzima iNOS, como um parâmetro de definição do perfil de polarização das células RAW 264.7 tratadas com o vTs. Em relação à iNOS, a expressão da mesma acompanhou os dados de produção de NO, ou seja, o veneno sozinho não induziu a expressão da enzima. No entanto, assim como na avaliação de NO, os macrófagos tratados com veneno associado ao LPS ou *E. coli* apresentaram um aumento na expressão da enzima iNOS. Esse aumento, assim como para o CD86, foi abaixo da expressão da iNOS nos macrófagos M1, mas acima do padrão apresentado pelos macrófagos M2.

Nesse contexto, a forma como a L-arginina é utilizada tem sido associada com a imunorregulação e desenvolvimento de patologias. Na polarização de macrófagos, a atividade das enzimas iNOS ou arginase (Arg1), caracterizam os

perfis M1 e M2 de resposta, respectivamente (ITALIANI; BORASCHI, 2014). As duas enzimas utilizam L-arginina como substrato, levando à produção de L-citrulina e óxido nítrico (NO), ou L-ornitina e ureia, respectivamente por macrófagos M1 ou M2 (MODOLELL *et al*, 2009) Dessa forma, a expressão da iNOS nos macrófagos estimulados com veneno, principalmente no contexto da presença do LPS ou a própria *E. coli*, caracterizam um perfil fenotípico M1 de polarização.

De uma forma geral, o tratamento com veneno de *T. serrulatus* mostrou-se eficiente em ativar os macrófagos. Esses resultados nos permitem confirmar, como discutido anteriormente, algumas possíveis vias de sinalização descritas como envolvidas na ativação dos macrófagos pelo vTs. O tratamento com o veneno potencializou a resposta fagocítica, bem como a atividade microbicida à *E. coli*. Ainda, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, na secreção de citocinas (MCP-1 e TNF- α) e de marcadores fenotípicos (CD86 e iNOS), trouxeram resultados relevantes para caracterização da ação do vTs como imunomodulador. E, ainda mais relevante, o tratamento com veneno de *T. serrulatus* induziu a polarização de um macrófago M1 com características de um “clássico”, mas com um perfil intermediário. A indução desse perfil, no contexto de respostas à infecções, é interessante, pois caracteriza-se por um macrófago responsivo ao patógeno, mas que não induz uma inflamação potencialmente deletéria.



7 CONCLUSÃO

O tratamento *in vitro* com veneno de *Tytilus serrulatus* mostrou ser eficaz na indução ou potencialização de funções importantes dos fagócitos mononucleares. O vTs ativou mecanismos essenciais da resposta dos macrófagos RAW 264.7:

- Aumento da atividade fagocítica em relação à partículas de Zymosan e *E. coli*;
- Potencialização da atividade microbicida a *E. coli*;
- Ação sinérgica ao LPS no aumento da produção de NO, mesmo não induzindo a produção desse reativo por si;
- Indução da geração de espécies reativas de oxigênio, H₂O₂;
- Elevou a produção de citocinas inflamatórias, como MCP-1 e TNF- α ;
- Aumentou a expressão de CD86 e iNOS, marcadores importantes para o perfil M1 de polarização.

Os dados gerados apoiam a nossa hipótese de que o vTs apresenta potencial para ativação e modulação de macrófagos, polarizando-os para o perfil M1 de resposta. Dessa forma, nosso trabalho abre novas perspectivas para o uso veneno de *T. serrulatus*, podendo levar ao desenvolvimento de novas terapias para o controle de infecções baseadas na modulação do Sistema Imunológico, especificamente na polarização de macrófagos.

REFERÊNCIAS¹

BASCONES-MARTINEZ, A. *et al.* Immunomodulatory drugs: Oral and systemic adverse effects. **Oral Cir Bucal**, v. 19 p. 24–31, 2014.

BERMUDEZ, S. *et al.* NADPH oxidase isoform expression is temporally regulated and may contribute to microglial/macrophage polarization after spinal cord injury. **Mol Cell Neurosci**, v. 77, p. 77-53, 2016.

BRESSLER, B. *et al.* Site-Specific Immunomodulator: A Novel Treatment for Crohn's Disease. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

BORÁN MS, BALTRONS MA, GARCÍA A. The ANP-cGMP-protein kinase G pathway induces a phagocytic phenotype but decreases inflammatory gene expression in microglial cells. **Glia**, v. 56, p. 394-411, 2008.

BRASIL. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

_____. Manual de controle de escorpiões / Ministério da saúde, secretaria de Vigilância em saúde, Departamento de Vigilância epidemiológica. – Brasília: Ministério da saúde, 2009.

CARDOSO, A. D. **Efeito do veneno de *Tityus serrulatus* sobre a infecção *in vitro* de macrófagos murinos**. Trabalho de conclusão de curso (monografia) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Maranhão, 2014.

CHAN, A. S. H. *et al.* Imprime PGG, a yeast β -glucan immunomodulator, has the potential to repolarize human monocyte-derived M2 macrophages to M1 phenotype. **J. Immunother Cancer**, v. 32, p.191, 2014.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

CHAWLA, A. Control of macrophage activation and function by PPARs. **Circ. Res**, v. 106, p. 1559–1569, 2010.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 826–837, 2010.

COLOGNA, C. T. *et al.* *Tityus serrulatus* Venom and Toxins: An Overview. **Protein. Pept. Lett**, v. 16, p. 920-932, 2009.

COURAUD, F. *et al.* Two types of toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. **Toxicon**, v. 20, p. 9-16, 1984.

DORCE, V. A. C.; SANDOVAL, M. R. L. Brazilian scorpion venoms: pharmacological aspects. **Ciênc. Cult**, v. 44, p. 187-191, 1992.

ELAHI, M. M. *et al.* Tumor necrosis factor alpha –308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 163–172, 2009.

FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. **J. Autoimmun**, v. 33, p. 222–230, 2009.

FARIAS, J. H. C. *et al.* Effects of Stingless Bee Propolis on Experimental Asthma. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1-8, 2014

FIALHO, E. M. S.; N. *et al.* Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 58, p. 480-5, 2011.

FORTES, T. S. *et al.* Desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos após tratamento *in vitro* com mesocarpo de babaçu. **Mart. Rev Cienc Saúde**, v. 11, p. 101-105, 2009.

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, p.49-55, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Ver Immunology**, v. 5, p. 953-964, 2005.

GORDON, S. Innate immune functions of macrophages in different tissue environments. **J Innate Immun**, v. 4, p. 409–10, 2012

GORDON, S.; PLÜDDEMANN , A.; ESTRADA, F. M. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. **Immunological Reviews** v. 262, p. 36-55, 2014.

GUREVITZ, M. *et al.* The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 473-489, 2007.

HEGDE, M. *et al.* Novel levamisole derivative induces extrinsic pathway of apoptosis in cancer cells and inhibits tumor progression in mice. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

HORSTHEMKE, M. *et al.* Multiple Roles of Filopodial Dynamics in Particle Capture and Phagocytosis, and Phenotypes of Cdc42 and Myo10 Deletion. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, 2017.

INOUE, S. *et al.* Heat Shock Transcription Factor 1 Opens Chromatin Structure of Interleukin-6 Promoter to Facilitate Binding of an Activator or a Repressor. **THE journal of biological chemistry**. v. 282; p. 33210–33217, 2007.

ITALIANE, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 1-22, 2014.

JANG, S.; JIMLAY, J. A. Hydrogen peroxide inactivates the Escherichia coli Isc ironsulfur assembly system, and OxyR induces the Suf system to compensate. **Mol Microbiology**, v. 78, p. 1448-1467, 2010

KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, p. 373–384, 2010.

KOMOHARA, Y. *et al.* Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **Journal of Pathology**, v. 216, v. 15- 24, 2008.

KORNS, D. *et al.* Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. **Front Immunol**, v. 8, p. 2-57, 2011.

KRESINSKY, A. *et al.* Phagocytosis of bone marrow derived macrophages is controlled by phosphoinositide 3-kinase γ . **Immunol Lett**, v. 180, p. 9-16, 2016.

KUTLU, B. *et al.* Molecular Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Pancreatic -Cells. **Diabetes**, v. 52, 2003.

LI, C.; LEVIN, M.; KAPLAN, D. L. *et al.* Bioelectric modulation of macrophage polarization. **Nature Scientific Reports**, v. 6, p. 21-44, 2016.

LINLEY, E. *et al.* Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access**, 2012

LIU, P. *et al.* Escherichia coli and Candida albicans induced macrophage extracellular trap-like structures with limited microbicidal activity. **PloS one**, v. 9, n. 2, 2014.

MACHADO, J. L. *et al.* Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-10, 2012.

MACIEL, M. C. G *et al.* *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Toxicon**, v. 89, p. 1-8, 2014.

MAMNUR RASHID, M.; SARDAR, M; ISLAM, M. R. *In vitro* phagocytic study of blood leucocytes and peritoneal macrophages of walking catfish *Clarias batrachus* (=am.) against *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli*. **Bangladesh J Hsh. Res**, v. 6; p. 35-41, 2002.

MANTOVANI, A. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophage as a paradigm for polarized M2 monocytes phagocytes. **Trends Immunology**, v. 23, p. 549-55, 2002.

MANTOVANI. A.; LOCATI. M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 33, p.1478-83, 2013.

MARTINEZ F. O., GORDON S., LOCATI M., AND MANTOVANI A., Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. **Journal of Immunology**, vol. 177, no. 10, pp. 7303–7311, 2006.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v.27, p. 451–483, 2009.

MARTINEZ, F. O. Regulators of macrophage activation. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 1531–1534, 2011.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000 prime reports**, v. 13, p. 1-13, 2014.

MCGRATH K. E.; FRAME J. M.; PALIS J. Early hematopoiesis and macrophage development. **Semin Immunol**, v .6, p. 379-87, 2015.

MEKI, A. R. M. A.; EL-DEAN, Z. M. M. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. **Toxicon**, v.36, p.1851-1859, 1998.

MIA, S. *et al.* An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 79, p. 305–314, 2014.

MILLS, C. D.; LEY, K. M1 and M2 Macrophages: the Chicken and the Egg of Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 39, p. 716-726, 2014.

MODOLELL, M. *et al.* Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, p. 469-480, 2009.

MOORE, L. B. *et al.* Loss of MCP-1 alters macrophage polarization and reduces NFκB activation in the foreign body response. **Acta Biomater**, v. 11, p. 37–47, 2015.

MORETÃO, M. P. *et al.* Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide from the gum of *Anadenanthera colubrina*. **Immunology Letters**, v. 93, p. 189-197, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, pp.55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v.8, p. 958–69, 2008.

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: na integrated view. **Immunol Rev**, v. 219, p. 88-102, 2007.

NASCIMENTO, F. R. *et al.* Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Science**, v. 78, p. 2650-2653, 2006.

NASCIMENTO, F. R. *et al.* Differential Effects of Subchronic and Chornic Oral Treatments with *Orbignya Phalerata* Mart. Mesocarp on the Inflammatory Response. In: V.K.Gupta. (Org.). Comprehensive Bioactive Natural Products, Immunomodulation & Vaccine Adjuvants. New York: **Studium Press LLC**, USA, v. 5, p. 267-281, 2010.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S. *et al.* Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**, v. 13, p. 23-32, 2003.

OMAR, H.; EL-DIN, M. The biological and medical significance of poisonous animals. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 3, p. 25-41, 2013.

PESSINI, A. C. *et al.* A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, p. 1495-1504, 2001.

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

PETRICEVICH V.L., REYNAUD E., CRUZ A.H., POSSANI L.D. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. **Clin Exp Immunol**. V.154. p.415-23, 2008.

PETRICEVICH, V.L. Scorpion venom and the inflammatory response. **Mediators Inflamm**, 2010.

PIMENTA A.M.; DE LIMA M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science**, v. 11, 2005.

PINELLO, K. C. *et al.* Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. **Life Sci**, v. 16, p. 1287-92, 2006.

PINTAR, A.; POSSANI, L. D.; DELEPIERRE, M. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a β -scorpion neurotoxin acting on sodium channels. **J. Mol. Biol.**, v. 287, p. 359-367, 1999.

PORTA, C. *et al.* Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. **Immunobiology**, v. 214, p. 761-777, 2009

POSSANI, L. D. *et al.* Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **The Febs Journal**, v. 264, p. 287–300, 1999.

REN G. *et al.* Effects of lipopolysaccharide core sugar deficiency on colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.** pii: JB.00094-16, 2016.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas **The Journal of clinical investigation**, v.122, p. 787-795, 2012.

SOARES, M.R.M.; AZEVEDO, C.S.; MARIA, M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 35, p. 359-363, 2002.

SULTANA, N.; SAIFY, Z. S. Naturally occurring and synthetic agents as potential anti-inflammatory and immunomodulants. **Antiinflammatory Antiallergy Agents Med**, v. 11, p. 3-19, 2012.

TAN, Hor-Yue, *et al.* Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. **Rev. Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 16, 2016.

VOGEL, D. Y. *et al.* Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. **J Neuroinflammation**, p. 10-35, 2013.

VON KNETHEN, A. *et al.* 5-Lipoxygenase contributes to PPAR γ activation in macrophages in response to apoptotic cells. **Cell Signal**, v. 25 p. 27- 38, 2013.

WEISS, G. *et al.* Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological reviews**, v. 264, p. 182-203, 2015.

WEN, F. H.; SANTALUCIA, M. Vigilância dos Acidentes por Animais Peçonhentos. **Apostila do Programa de Vigilância dos Acidentes por Animais Peçonhentos da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde**, 2005.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. **International Journal of Pharmaceutics, Amsterdam**, v. 288, p. 369–376, 2005.

XU, Q. *et al.* NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation. **J Biol Chem**, v. 200 p. 30-41, 2016.

YAMASAKI R, *et al.* Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. **J Exp Med**; v. 211, p. 1533–1549, 2014.

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

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

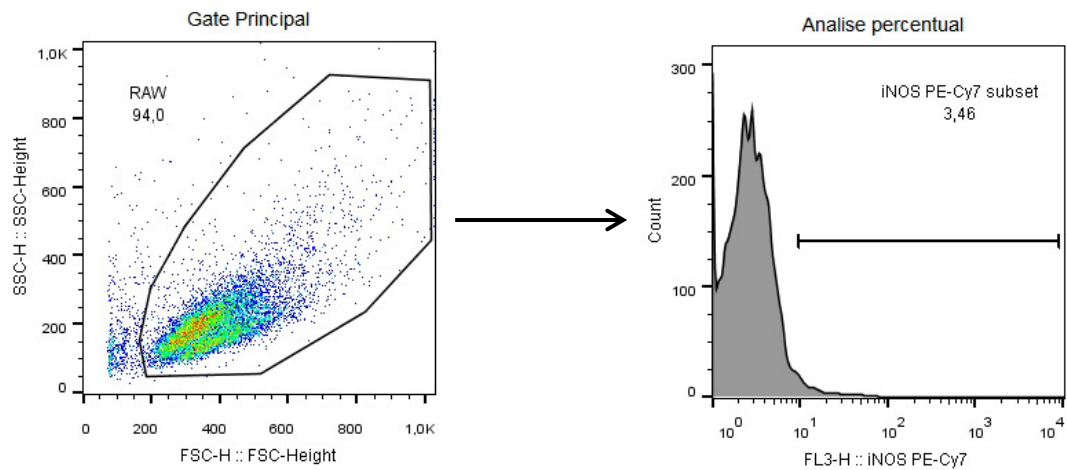
ZOCCAL, K. F. *et al.* TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators **PLoS One**, v.9, p.88 -174, 2014.

ZOCCAL, K. F. *et al.* Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications**, v. 93, p. 90-97, 2016.



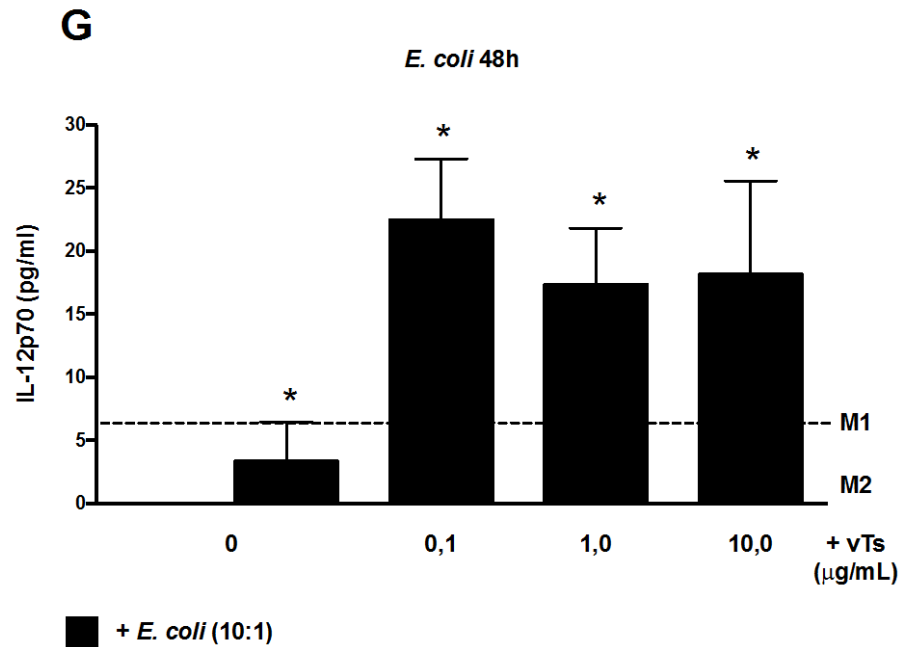
APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de Imunofenotipagem



Para a análise de imunofenotipagem levou-se em consideração os parâmetros de tamanho (Forward Scatter, FSC) e complexidade celular (Side Scatter, SSC) para estabelecimento do gate de aquisição (A), em seguida as células foram avaliadas gerando-se histogramas para a determinação e análise de percentual de células expressando os marcadores selecionados (B).

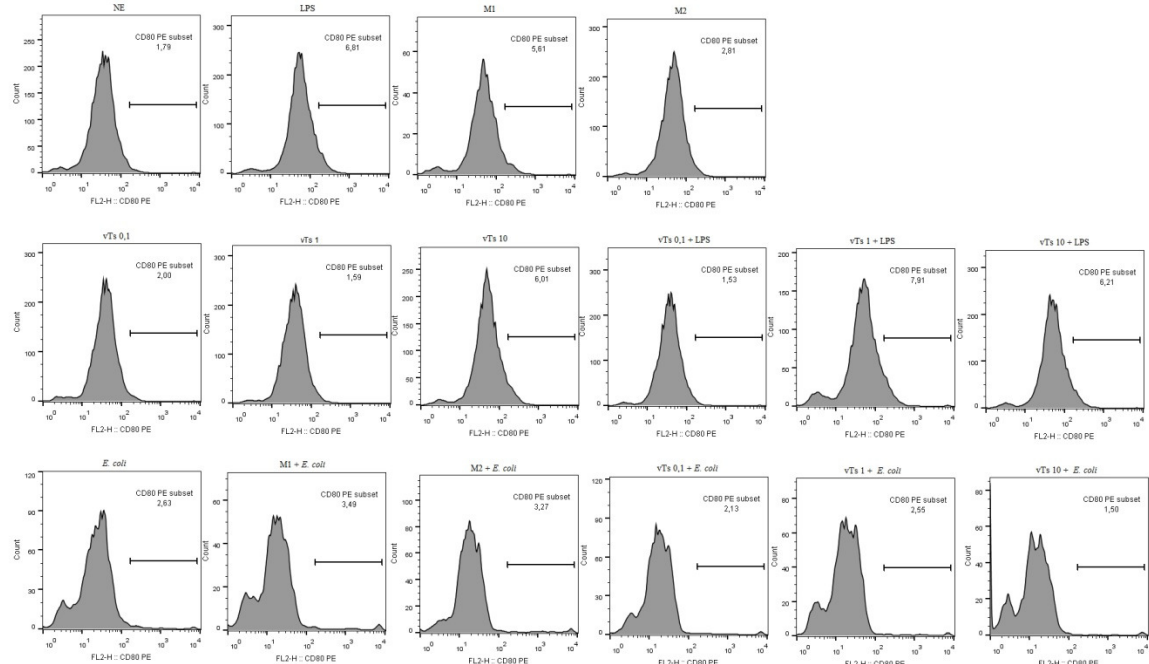
APÊNDICE B – O tratamento com vTs aumentou a produção de IL-6, MCP-1 e TNF- α por macrófagos murinos



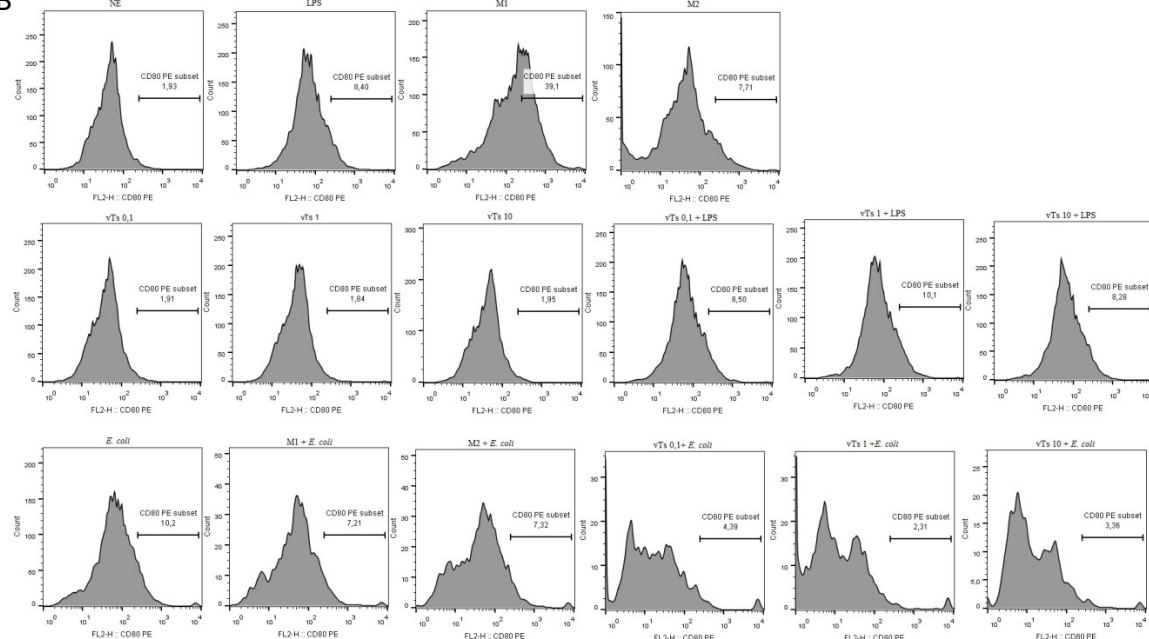
Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 µg/mL) ou *E. coli* (cepa 352; 10:1), isoladamente (barras brancas) ou em associação (barras pretas), por 48 horas. Ainda, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL; linha tracejada) ou perfil M2 (IL-13 20ng/mL + IL-4 40ng/mL; linha pontilhada), pelos mesmos períodos de tempo. Após os tratamentos, foi adicionado DHR (375 ng/mL) aos poços da placa para procedermos com análise da produção de H_2O_2 no citômetro de fluxo. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram retirados para avaliação da produção de IL-12p70 (G) por citometria de fluxo com o *kit inflammation* CBA. Os resultados expressam a média da concentração de citocina (pg/mL) $\pm$ erro padrão ($n = 2$ experimentos, em triplicata) de citocinas. * para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle não estimulado; # para $p < 0,05$, em teste de *one-way* ANOVA, comparado ao grupo controle estimulado apenas com veneno, sem LPS ou *E. coli*.

APÊNDICE C – Histogramas representativos de CD80

A

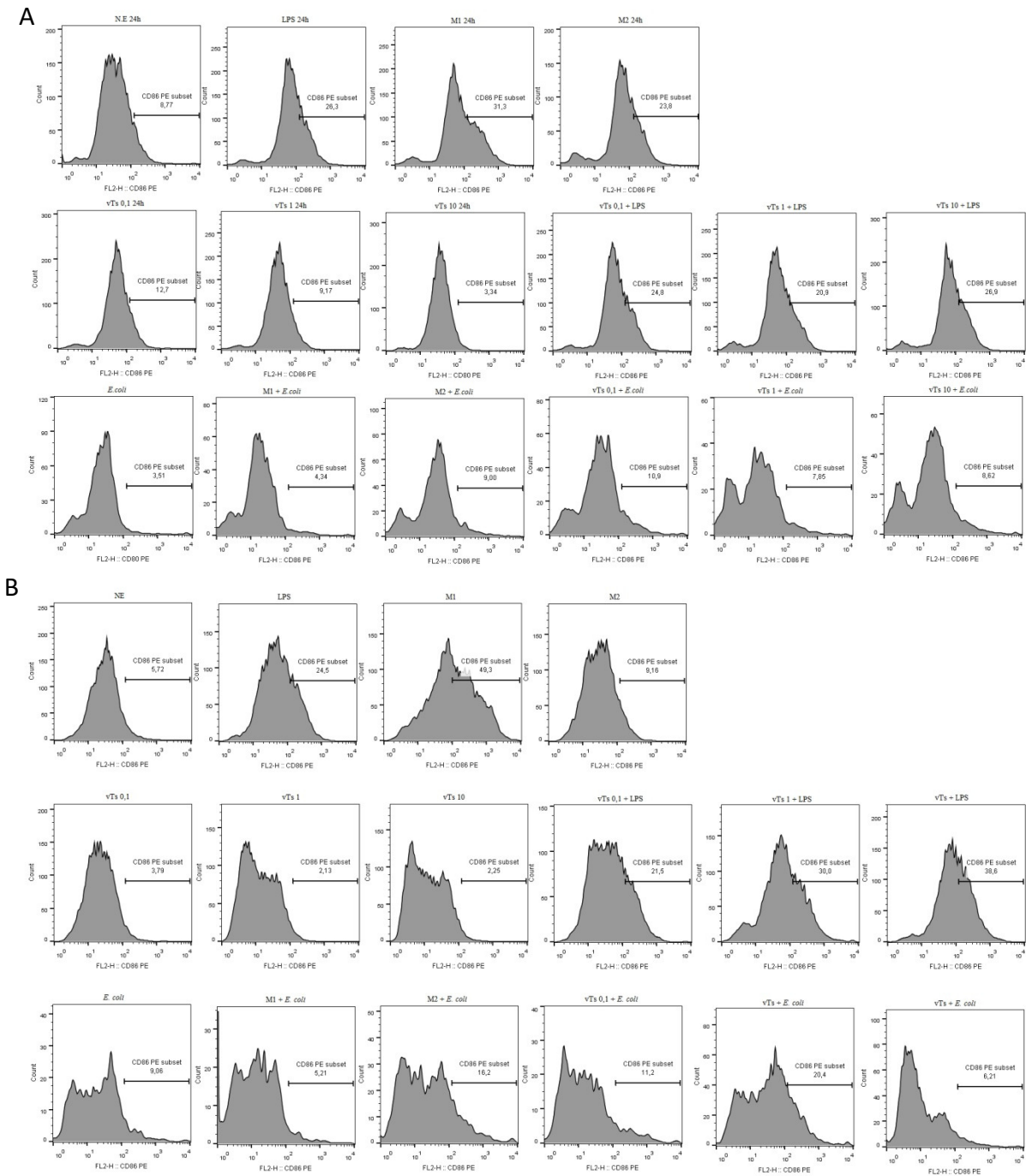


B



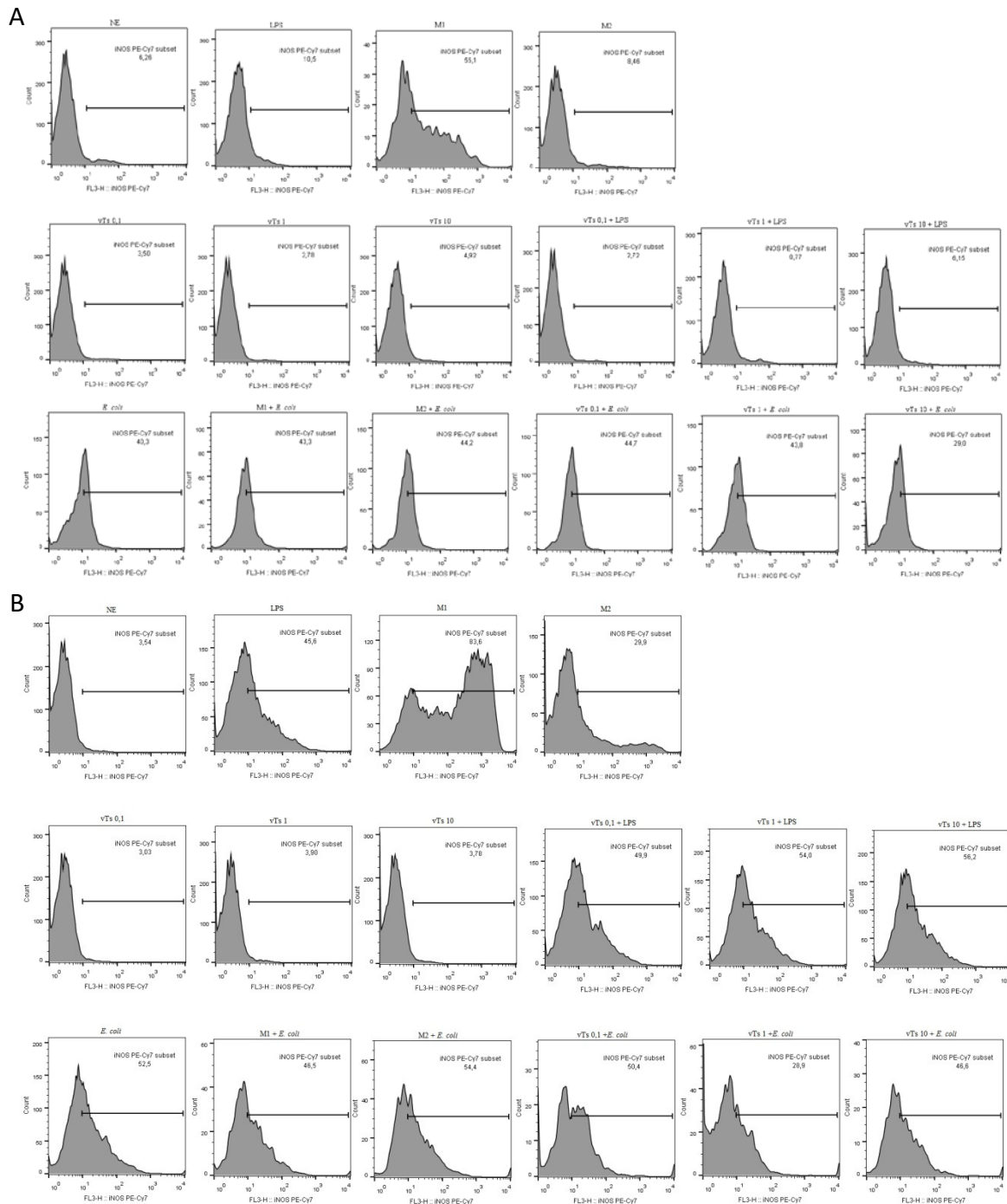
Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 μ g/mL) ou LPS ou, isoladamente ou em associação com LPS (10 μ g/mL) ou *E. coli* (cepa 352; 10:1), por 24 (A) ou 48 horas (B). Para comparação, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL) ou perfil M2 (IL-13 - 20ng/mL + IL-4 40ng/mL), pelos mesmos períodos de tempo. Após tratamento, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para avaliação da expressão de CD80, CD86 ou iNOS por citometria de fluxo. Os resultados representam o percentual de células RAW 264.7 expressando CD80.

APÊNDICE D - Histogramas representativos de CD86



Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 μ g/mL) ou LPS ou, isoladamente ou em associação com LPS (10 μ g/mL) ou *E. coli* (cepa 352; 10:1), por 24 (A) ou 48 horas (B). Para comparação, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL) ou perfil M2 (IL-13 - 20 ng/mL + IL-4 40 ng/mL), pelos mesmos períodos de tempo. Após tratamento, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para avaliação da expressão de CD80, CD86 ou iNOS por citometria de fluxo. Os resultados representam o percentual de células RAW 264.7 expressando CD86.

APÊNDICE E - Histogramas representativos de iNOS



Células RAW 264.7 (1×10^6 / mL) foram tratadas, ou não, com veneno de *T. serrulatus* (vTs – 0,1; 1,0; 10,0 μ g/mL) ou LPS ou, isoladamente ou em associação com LPS (10 μ g/mL) ou *E. coli* (cepa 352; 10:1), por 24 (A) ou 48 horas (B). Para comparação, células foram polarizadas para o perfil M1 (IFN- γ - 10 ng/mL + LPS 200 ng/mL) ou perfil M2 (IL-13 - 20 ng/mL + IL-4 40 ng/mL), pelos mesmos períodos de tempo. Após tratamento, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para avaliação da expressão de CD80, CD86 ou iNOS por citometria de fluxo. Os resultados representam o percentual de células RAW 264.7 expressando iNOS.