UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de
Tityus serrulatus sobre funções de linfócitos T humanos**

Andrea Casella Martins

RIBEIRÃO PRETO – SP

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de *Tityus*
serrulatus sobre função de linfócitos T humanos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Andréa Casella Martins

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott

*Versão corrigida da **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Casella-Martins, Andrea

Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de *Tityus serrulatus* sobre funções de linfócitos T humanos. Ribeirão Preto, 2011.

63 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia.

Orientador: Crott, Luciana Simon Pereira.

1. Imunomodulação. 2. Imunofenotipagem. 3. Linfócitos T. 4. Proliferação Celular. 5. Citocinas. 6. *Tityus serrulatus*. 7. Venenos Animais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Andrea Casella Martins

Título do trabalho: Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de *Tityus serrulatus* sobre funções de linfócitos T humanos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia

Orientador(a): Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

A Deus, por concretizar a realização de um sonho. Por ter me concedido a vitória em todas as minhas batalhas.

Agradecimentos

À você querida profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott, agradeço de forma muito especial, sua confiança, apoio, incentivo, paciência, amizade, generosidade e orientação me ajudaram em meu crescimento científico, profissional e pessoal em todos esses anos de convivência.

Ao meu pai Aloísio Casella pelos exemplos, principalmente por me ensinar nunca desistir de um sonho, a minha mãe Maria José Bacalá Casella pelas orações. Gostaria que vocês sentissem a mesma felicidade que sinto agora.

Ao meu esposo Alfredo Miguel Martins pelo amor, por ser a minha família e por sonhar comigo. Sua paciência, dedicação e ajuda foram preciosas na luta para vencer todos os obstáculos, sem seu apoio eu jamais realizaria este sonho. Amo-te.

Ao meu amado filho Cauê Casella Scudeller que compreendeu as minhas decisões e me apoiou sempre e incondicionalmente. Filho é por você que cheguei até aqui. Desejo-lhe um futuro brilhante e cheio de conquistas.

Aos meus irmãos Patrícia Casella Zuri e José Guilherme Casella que amo profundamente. Pessoas ao lado das quais desfrutei momentos alegres e agora as lembranças destes, me trazem imensa saudades.

Aos meus sobrinhos Elias Paulo e Ana Julia aqueles que a vida está apenas começando e a quem eu desejo um futuro próspero. A tia Deia ama vocês.

À minha avó Elda Benfatti Casella que não pôde ver os netos tornarem-se adultos, pois a muito tempo partiu, mas com certeza se orgulharia dos netos e bisnetos.

À minha sogra Maria Aparecida Ferreira Martins por me acolher, incentivar e cuidar de mim como filha.

À equipe do laboratório de Imunologia Clínica, as alunas Juliana C. Pereira e Cíntia Nogueira dos Santos e os funcionários, Tânia Mara Casare Ogasawara e Rubens Eduardo da Silva, por serem parceiros em todas as horas boas e difíceis, mas principalmente pela amizade. Obrigada pelo carinho com que me acolheram desde que cheguei, adoro vocês!

À Lorena Ayres que foi muito especial em todos os momentos desse trabalho, contribuindo muito para que este trabalho se concretizasse.

À Tânia Mara Casare Ogasawara, sua cumplicidade e parceria foram fundamentais para esta conquista.

À Nancy M. Ferreira Rodrigues com sua alegria e disposição me ajudou sempre, que Deus te dê força nessa batalha.

Aos amigos que fiz durante a jornada, Denise, Karina, Sandra, pela amizade e força nos momentos difíceis.

Aos amigos Fernando, Lílían, Francine, Bianca que vieram mais tarde, mas me fizeram mais feliz.

À todos os meus familiares e amigos, por sempre torcerem por mim.

Ao prof. Auro Nomizo, pelas dicas preciosas.

À profa. Dra. Eliane Candiani Arantes, pela valiosa colaboração.

À técnica Karla Bordón (laboratório de Toxicología), por sempre estar disposta a ajudar no que fosse preciso.

À funcionária Fabiana Moraes (citômetro de fluxo) por ser tão prestativa, amiga e parceira.

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação.

Muito obrigada a todos vocês.

RESUMO

CASELLA-MARTINS, A.C. **Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de *Tityus serrulatus* sobre funções de linfócitos T humanos** 2011, 63f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Escorpiões da família **Buthidae** estão envolvidos na maioria dos envenenamentos em todo o mundo. *Tityus* é um dos gêneros dessa família, sendo *Tityus serrulatus* a espécie mais perigosa, por estar envolvida em envenenamentos graves, nos quais as vítimas são crianças, podendo levar a óbito. As manifestações da picada incluem dor local, hipersensibilidade, hipertensão, manifestações cardiovasculares e edema pulmonar. A peçonha do *T. serrulatus* contém, entre outros componentes, várias toxinas que atuam em canais de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} e que são responsáveis pelos efeitos tóxicos do veneno. Estudos recentes mostraram que a peçonha de *T. serrulatus* pode ativar macrófagos que são críticos na resposta imune e desempenham papel fundamental na resposta humoral e celular. Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos diretos dessas peçonhas sobre linfócitos humanos. Considerando que a modulação de funções celulares como proliferação, ativação e produção de citocinas pode desempenhar papel importante em envenenamentos, o presente estudo propôs: a) avaliar o efeito citotóxico do veneno bruto de *Tityus serrulatus* (VTs) sobre células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC); b) analisar o efeito do VTs sobre a modulação da expressão de marcadores fenotípicos (CD3, CD4, CD8 e CD19) e de marcadores de ativação celular, incluindo CD69, CD25 e HLA-DR em células T e B; c) avaliar o efeito do VTs sobre a proliferação de linfócitos T; d) avaliar a capacidade do VTs em modular a produção de citocinas pelas PBMC. Ensaios de citotoxicidade foram realizados pela técnica do MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) e mostraram que as concentrações de 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ do VTs apresentaram citotoxicidade baixa a moderada para PBMC (12,7, 22,2 e 23,7% de redução na viabilidade celular, respectivamente). Concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ não foram citotóxicas. Com base nesses ensaios, estas últimas concentrações foram utilizadas nos ensaios subsequentes. A citometria de fluxo foi empregada para avaliação da proliferação celular, da expressão de marcadores fenotípicos e de ativação celular, bem como para a quantificação de citocinas nos sobrenadantes de culturas celulares. As concentrações utilizadas não induziram alterações significativas nas subpopulações de linfócitos e não modificaram a expressão de marcadores de ativação em linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e B, após 24h de cultivo. O ensaio de proliferação celular, utilizando marcação concomitante com diacetato carboxifluoresceína succinimidyl ester (CFSE) e anticorpos monoclonais contra marcadores fenotípicos e marcadores de ativação celular, permitiu que se avaliasse não só a proliferação, mas a discriminação das diferentes subpopulações celulares e o estado de ativação das mesmas após 96h de cultivo. Os resultados sugerem que o VTs inibe a proliferação de linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (PHA), e em especial a porcentagem de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ (linfócitos T citotóxicos ativados). O VTs não foi capaz de induzir proliferação celular. Em contraste, o VTs quando adicionado isoladamente à cultura de PBMC, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, induziu a produção de IL-6 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), uma citocina pró-inflamatória que desempenha papéis importantes nas respostas imunes

inata e adaptativa. A secreção aumentada de IL-6, portanto, não está vinculada a aumento na proliferação celular. A presença do VTs concomitantemente à PHA apresentou tendência para inibição da produção de citocinas por células estimuladas com a PHA, como IL-10, TNF e IFN-gama. Os resultados sugerem que o VTs é uma fonte potencial de substâncias com ações imunomoduladoras sobre linfócitos T humanos e estimulam novas investigações para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos, incluindo estudos que considerem a participação dos canais iônicos de linfócitos T nos fenômenos observados. Essas investigações, juntamente com a identificação dos componentes da peçonha, responsável pela atividades observadas, poderão contribuir para a descoberta de ferramentas para estudo dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento, bem como para a descoberta de novas alternativas de tratamento para doenças mediadas pelo sistema imune.

Palavras-chaves: imunomodulação, imunofenotipagem, linfócitos T, proliferação celular, citocinas, *Tityus serrulatus*, venenos animais.

ABSTRACT

CASELLA-MARTINS, A. **Investigation of the immunomodulatory effects of crude venom of *Tityus serrulatus* on human T lymphocytes functions**, 2011, 63f. Master's Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Scorpions of the Buthidae family are involved in most envenomations worldwide. *Tityus* is one of the genera of this family, being *Tityus serrulatus* the most dangerous species, because it is involved in severe envenomation, in which the victims are children and it can lead to death. The manifestations of scorpion sting are classified from mild to severe and its clinical signs include local pain, hypersensitivity, hypertension, cardiovascular manifestations and pulmonary edema. *T. serrulatus* venom contains, among other components, various toxins that act on K^+ , Na^+ and Ca^{2+} channels, and are responsible for the toxic effects of the venom. Recent studies showed that the venom of *T. serrulatus* (VTs) can activate macrophages that are critical to immune response and play a key role in the humoral and cellular response. However, little is known about the direct effects of these venoms on human lymphocytes. Considering that the modulation of cellular functions such as proliferation and induction of cytokines production may play an important role in envenomation, the study proposed: a) to evaluate the cytotoxic effects of crude venom on peripheral blood mononuclear cells, b) to examine the effect of VTs on the modulation of expression of phenotypic markers (CD3, CD4, CD8 and CD19) and markers of cellular activation, including CD69, CD25 and HLA-DR on T and B cells c) to evaluate the VTs effect on the proliferation of T lymphocytes d) to evaluate the ability of VTs to modulate cytokine production by PBMC. Cytotoxicity assays were performed by the technique of MTT (3 - (4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) and showed that VTs concentrations of 500, 1000 and 2000 $\mu\text{g/mL}$ showed low to moderate cytotoxicity to PBMC (12.7, 22.2 and 23.7% reduction in cell viability, respectively). Concentrations of 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ were not cytotoxic. Based on these tests, these concentrations were used in subsequent trials. Flow cytometry was used to assess cell proliferation, expression of phenotypic markers and cell activation, as well as for the quantification of cytokines in supernatants of cell cultures. The concentrations used did not induce significant changes in subpopulations of lymphocytes and did not modify the expression of activation markers on $CD4^+$, $CD8^+$ and B cells, after 24 hours of culture. The cellular proliferation assay, using simultaneously diacetate carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and monoclonal antibodies against phenotypic markers and cell activation markers, allowed the evaluation not only of proliferation, but the discrimination of different cell subpopulations and activation state of the same after 96h of culture. The results suggest that VTs inhibits the proliferation of lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin (PHA), and in particular the percentage of T lymphocytes $CD8^+ CD25^+$ (activated cytotoxic T lymphocytes). The VTs were not able to induce cell proliferation. In contrast, the VTs when added alone to the culture of PBMC at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ induced production of IL-6 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), a proinflammatory cytokine that plays important roles in innate and adaptive immune responses. The increased secretion of IL-6, therefore, is not linked to increased cell proliferation. The presence of VTs concurrently with PHA tended to inhibit cytokine production by cells stimulated with PHA, as IL-10, TNF and

IFN-gamma. The results suggest that the VTs is a potential source of substances with immunomodulatory actions on human T lymphocytes and stimulate further research to elucidate the mechanisms of action involved, including studies to consider the participation of ion channels of T lymphocytes in the phenomena observed. These investigations, along with the identification of the components of the venom responsible for the observed activities may contribute to the discovery of tools to study the pathophysiological mechanisms involved in the envenomation as well as for the discovery of new treatment alternatives for diseases mediated by the immune system.

Keywords: immunomodulation, immunophenotyping, T lymphocytes, cell proliferation, cytokines, *Tityus serrulatus*, animal venoms

RESUMEN

CASELLA-MARTINS, A. **Investigación de los efectos inmunomoduladores de veneno crudo de *Tityus serrulatus* en las funciones de los linfocitos T humanos**, 2011, 63F. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, de 2011.

Escorpiones de la familia Buthidae están involucrados en la mayoría de las intoxicaciones en todo el mundo. *Tityus* es uno de los géneros de esta familia, *Tityus serrulatus* es la especie más peligrosa, al estar involucrados en casos de envenenamiento grave, en el que las víctimas son niños y puede conducir a la muerte. Las manifestaciones de la picadura de escorpiones se clasifican de leves a severas y los signos clínicos incluyen dolor local, hipersensibilidad, hipertensión, manifestaciones cardiovasculares y edema pulmonar. El veneno de *T. serrulatus* contiene, entre otros componentes, varias toxinas que actúan sobre los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} y son responsables de los efectos tóxicos del veneno. Estudios recientes muestran que el veneno de *T. serrulatus* puede activar a los macrófagos que son críticos para la respuesta inmune y tienen un papel clave en la respuesta humoral y celular. Teniendo en cuenta que la modulación de las funciones celulares como la proliferación y la inducción de la producción de citocinas pueden desempeñar un papel importante en los envenenamientos, el estudio propone: a) evaluar los efectos citotóxicos del veneno crudo de *Tityus serrulatus* (VTs) en las células mononucleares de la sangre periférica; b) analizar el efecto del VTs en la modulación de la expresión de marcadores fenotípicos (CD3, CD4, CD8 y CD19) y los marcadores de activación celular, como CD69, CD25 y HLA-DR en las células T y B; c) evaluar el efecto del VTs sobre la proliferación de los linfocitos T d) evaluar la capacidad del VTs para modular la producción de citocina por PBMC. Ensayos de citotoxicidad se realizaron mediante la técnica de MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) y mostraron que las concentraciones de 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/mL}$ del VTs mostró baja a moderada citotoxicidad para PBMC (12,7, 22,2 y 23,7% de reducción en la viabilidad celular, respectivamente). Concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ no fueron citotóxicas. En base a estas pruebas, estas últimas concentraciones se utilizaron en los ensayos posteriores. Citometría de flujo fue utilizada para evaluar la proliferación celular, la expresión de marcadores fenotípicos y de activación de las células, así como para la cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de cultivos celulares. Las concentraciones utilizadas no indujeron cambios significativos en las subpoblaciones de linfocitos y no modificaron la expresión de marcadores de activación de linfocitos $CD4^+$, $CD8^+$ y B, después de 24 horas de cultivo. El ensayo de proliferación celular utilizando simultáneamente diacetato caboxifluoresceína succinimidyl ester (CFSE) y anticuerpos monoclonales contra marcadores fenotípicos y marcadores de activación celular, permitió evaluar no solamente la proliferación, pero la discriminación de las diferentes subpoblaciones celulares y estado de activación del mismo después de 96h de cultivo. Los resultados sugieren que lo VTs inhibe la proliferación de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA), y en particular la porcentaje de los linfocitos T $CD8^+$ $CD25^+$ (activa los linfocitos T citotóxicos). El VTs no fue capaz de inducir la proliferación celular. Por otro lado, el VTs cuando añadido sólo a la cultura de PBMC en concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, indujo la producción de IL-6 ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente),

una citocina proinflamatoria que tiene un papel importante en la respuesta inmune innata y adaptativa. El aumento de la secreción de IL-6, por lo tanto, no está vinculado a la proliferación celular aumentada. La presencia del VTs al mismo tiempo que la PHA tiene una tendencia a inhibir la producción de citocinas por las células estimuladas con PHA, como IL-10, TNF e IFN-gamma. Los resultados sugieren que lo VTs es una fuente potencial de sustancias con acciones inmunomoduladoras en los linfocitos T humanos y estimulan nuevas investigaciones para aclarar los mecanismos de acción involucrados, incluyendo estudios para considerar la participación de los canales iónicos de los linfocitos T en los fenómenos observados. Estas investigaciones, junto con la identificación de los componentes del veneno responsables de las actividades observadas, pueden contribuir al descubrimiento de herramientas para estudiar los mecanismos implicados en el envenenamiento, así como para el descubrimiento de alternativas de tratamiento para las enfermedades mediadas por el sistema inmune.

Palabras clave: inmunomodulación, inmunofenotipo, linfocitos T, proliferación celular, citocinas, *Tityus serrulatus*, venenos animales.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> na viabilidade de PBMC	23
Figura 2. <i>Dot plots</i> representando a seleção de regiões (<i>gates</i>) correspondentes aos linfócitos T citotóxicos	25
Figura 3A. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> na porcentagem de linfócitos T CD4 ⁺ expressando CD69	26
Figura 3B. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> na porcentagem de linfócitos T CD4 ⁺ expressando CD25	26
Figura 3C. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> na porcentagem de linfócitos T CD4 ⁺ expressando HLA-DR.....	26
Figura 4A. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> na porcentagem de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD69	27
Figura 4B. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> na porcentagem de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD25	27
Figura 4C. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> na porcentagem de linfócitos T CD8 ⁺ expressando HLA-DR.....	27
Figura 5. Porcentagem de proliferação de linfócitos em diferentes períodos de incubação.....	30
Figura 6. <i>Dot plots</i> e histogramas representativos de um ensaio de proliferação de PBMC utilizando CFSE	31
Figura 7. Porcentagem de linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺	34
Figura 8. Histogramas representativos de um ensaio de proliferação de linfócitos CD3 ⁺ CD8 ⁺ em diferentes períodos de cultivo.....	35
Figura 9. Proliferação de linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺	36
Figura 10. Porcentagem de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD25 ⁺	37
Figura 11. Proliferação de linfócitos T CD8 ⁺ expressando CD25 ⁺	38
Figura 12. Porcentagem de linfócitos CD3 ⁺ CD4 ⁺	39

Figura 13. Proliferação de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺	39
Figura 14. Porcentagem de linfócitos T CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	40
Figura 15. Proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	40
Figura 16. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> nos níveis de IL-2	42
Figura 17. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> nos níveis de IL-6	43
Figura 18. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> nos níveis de IL-10	44
Figura 19A. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> nos níveis de TNF	45
Figura 19B. Efeito do veneno bruto de <i>Tityus serrulatus</i> nos níveis de IFN- γ	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Combinações de anticorpos monoclonais usados para identificar o tipo celular e diferentes marcadores de ativação	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CFSE	<i>5-(and – 6) – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CVF	<i>Cobra venom factor</i>
FII	Fração 2 da peçonha de <i>T. serrulatus</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HLA-DR	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 α	Interleucina – 1 alfa
IL-1 β	Interleucina – 1 beta
IL-2	Interleucina - 2
IL-4	Interleucina - 4
IL-5	Interleucina - 5
IL-6	Interleucina - 6
IL-8	Interleucina - 8
IL-10	Interleucina - 10
IL-13	Interleucina - 13
IL-17	Interleucina - 17
IFN- γ	Interferon - gama
Kv	Canal para íons de potássio dependente de voltagem
MAC	Complexo de ataque à membrana (do inglês <i>Membrane Attack Complex</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>)

MN	Células Mononucleares
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
NO	Óxido nítrico
NK	<i>Natural killer</i>
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i>
PAF	Fator ativador de plaquetas (do inglês Platelet – Activating Factor)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês Peripheral Blood Mononuclear)
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>Phycoerythin</i>)
PHA	Fitohemaglutinina (do inglês <i>Phytohemagglutinin</i>)
PMN	Polimorfonucleares (do inglês <i>Polymorphonuclear</i>)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
SBF	Soro bovino fetal
SC	Sistema complemento
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHN	Soro humano normal
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Ts1	Fração 1 da peçonha de <i>T. serrulatus</i>
VA	Via alternativa
VC	Via clássica
VL	Via das lectinas
VTs	Veneno bruto de <i>T. serrulatus</i>

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	iii
Resumen	v
Lista figuras	vii
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas e siglas	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Características do Veneno de Escorpião	4
1.2 Ações de venenos sobre a resposta inflamatória e sobre células do sistema imune	6
1.2.1 Resposta inflamatória.....	6
1.2.2. Macrófagos e linfócitos.....	7
1.2.3 Citotoxicidade	8
1.2.4 Ativação e proliferação celular	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Geral.....	13
2.2. Específicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Peçonha	15
3.2 Casuística.....	15
3.3 Modulação de eventos celulares por venenos	15
3.3.1 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	15
3.3.2 Ensaio de Citotoxicidade utilizando o MTT.....	16
3.3.3 Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo	17
3.3.4 Ensaio de proliferação celular utilizando CFSE.....	18
3.3.5 Ensaio de avaliação da produção de citocinas.....	19
3.4. Análise estatística	19

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)	22
4.2 Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo	23
4.3 Análise dos ensaios de proliferação de linfócitos	28
4.4 Análise dos ensaios de produção de citocinas	41
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7. ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

Os escorpiões pertencem à classe **Arachnida**, ordem **Scorpiones**. Existem aproximadamente 1600 espécies e subespécies de escorpiões distribuídas pelo mundo todo, agrupadas em treze famílias (MARCUSI *et al.*, 2011), das quais a mais importante é a **Buthidae**, uma vez que todos os escorpiões perigosos para o homem estão nela reunidos. No Brasil, os escorpiões mais perigosos pertencem à subfamília **Tityinae** e ao gênero *Tityus*, sendo as espécies *serrulatus* e *bahiensis* as principais causadoras de acidentes graves e por vezes fatais. *Tityus serrulatus* é o primeiro na lista de acidentes, seguido pelo *T. bahiensis*, *T. stigmurus*, *T. cambridgei* e *T. trivitatus* (MELLO – LEITÃO, 1945; BUCHERL, 1979; SISSOM, 1990; BARRAVIERA, 1994).

Picadas acidentais de escorpiões constituem um sério problema de saúde pública no Brasil, com aproximadamente 8000 casos anuais (Ministério da Saúde, 2001) (MENDES *et al.*, 2008). Nas regiões mais quentes, nos meses onde ocorrem aumentos da temperatura e da pluviosidade, os acidentes com escorpiões parecem ser bem mais frequentes do que demonstram as estatísticas oficiais, podendo assumir um perfil epidemiológico grave em determinadas áreas, sob certas circunstâncias (NETO *et al.*, 1994).

O veneno do escorpião *T. serrulatus* é mais perigoso toxicologicamente que os outros escorpiões brasileiros, sendo responsável pela morte por picadas de aproximadamente 1% em crianças e idosos (CARDOSO *et al.*, 1995).

Segundo dados do Centro de Controle de Intoxicações (CCI) da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas – USP - Ribeirão Preto, foram registrados cerca de 9228 casos de acidentes, vítimas de picadas de escorpiões durante os anos de 1982 a 2000, observando aumento nos últimos anos, provocado pela espécie *T. serrulatus*, com média de 700-800 casos/ano, aproximadamente 2 a 3 casos/dia (CARDOSO *et al.*, 2003). O *T. serrulatus* é o principal agressor em todos os casos graves de escorpionismo (CUPO *et al.*, 1998).

O quadro clínico em acidentes escorpiônicos é muito rico em sinais e sintomas, decorrentes dos efeitos dos neurotransmissores liberados em quase todos os setores do organismo (BARRAVIERA, 1994; CARDOSO, 2003). Para efeito de classificação quanto a gravidade pode-se dividir as manifestações clínicas em locais ou sistêmicas, que vão definir o escorpionismo como leve, moderado ou grave.

A dor no local da picada, uma constante no escorpionismo humano, pode ser discreta, restrita ao ponto de inoculação do veneno, ou insuportável, manifestando-

se sob a forma de queimação ou agulhada, acompanhada ou não de parestesias. Pode-se observar ainda no local, edema e hiperemia, acompanhados ou não de sudorese e piloereção local (CARDOSO, 2003).

Sistemicamente pode-se observar manifestações gastrointestinais, com náusea, vômito, diarreia, dor abdominal. As náuseas e principalmente os vômitos, quando abundantes, estão intimamente relacionados à gravidade do envenenamento. Manifestações respiratórias podem estar presentes, como a rinorreia, tosse, espirros, estertores pulmonares e sibilos. A taquipneia e a hiperpneia podem ser agravadas pelo aumento de secreção pulmonar. Nos casos mais graves, pode ocorrer bradipneia e respiração suspirosa (BARRAVIERA, 1994; CARDOSO, 2003). Essas alterações respiratórias foram descritas em pacientes com ou sem edema pulmonar, sendo atribuídas a efeitos de natureza reflexa das toxinas sobre o sistema parassimpático.

As manifestações cardiovasculares são caracterizadas por taquicardia e/ou bradicardia (alternadas ou não), hipo ou hipertensão, arritmias cardíacas, sensação de opressão torácica, insuficiência cardíaca, edema agudo e choque, sendo essas as manifestações mais graves do escorpionismo. Nas manifestações neurológicas, costumam ocorrer tremores, contrações musculares, agitação psicomotora e mioclonias. Cefaleia e convulsões, causadas por encefalopatias hipertensivas, e hemiplegias relacionadas com infarto cerebral, têm sido descritas mais raramente (BARRAVIERA, 1994; CARDOSO, 2003).

Em nível molecular, foi demonstrado que a maioria dos efeitos farmacológicos induzidos pela toxina escorpiônica são devidos as ações em sítios específicos dos canais de íons de sódio, com consequente despolarização das membranas das células excitáveis em todo o organismo. Em decorrência disso, há liberação maciça de catecolaminas e acetilcolinas pelas terminações nervosas pós-ganglionares do sistema simpático e parassimpático e da medula da supra-renal, as quais, atuando nos diferentes sistemas do organismo, são responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas observados no envenenamento escorpiônico humano (CARDOSO, 2003).

Pesquisas descrevem estudos na ativação e imunomodulação de macrófagos em resposta ao veneno de *T. serrulatus* (PETRICEVICH; REYNAUD; CRUZ; POSSANI; 2008). Os macrófagos estão envolvidos em diferentes mecanismos homeostáticos e eventos patológicos e podem estar comprometidos em interações complexas de organismos celulares (PETRICEVICH, 2005). Essas células têm

importante papel na resposta imune e na apresentação de antígenos ao sistema de defesa. Quando um macrófago entra em contato com um antígeno, ocorre um estímulo e eles se tornam ativados (PETRICEVICH; REYNAUD; CRUZ; POSSANI, 2008).

Em resposta a veneno, macrófagos secretam mediadores, tais como óxido nítrico (NO) e citocinas. As citocinas desempenham papel importante no orquestramento da cascata inflamatória, e podem ser consideradas como citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1, interleucina-8, e anti-inflamatórias como interleucina-10 (PETRICEVICH, 2004).

Apesar dos efeitos do veneno de *T. serrulatus* serem bem estudados *in vivo* (MAGALHÃES *et al.*, 1999 e PETRICEVICH, 2002) e *in vitro* (PETRICEVICH, 2002 e PETRICEVICH *et al.*, 2007), são poucas as informações no que diz respeito a resposta imunológica adaptativa.

1.1 Características do Veneno de Escorpião

O veneno de escorpião tem como principal componente as neurotoxinas e é fonte de diferentes classes de peptídeos que afetam as funções normais dos canais iônicos (POSSANI *et al.*, 1999).

A peçonha escorpiônica é antigênica e parcialmente solúvel em água e pode ser fracionada por centrifugação, obtendo-se uma fração insolúvel, não tóxica, constituída por mucoproteínas e restos de membranas e organelas celulares (WATT; SIMARD, 1984). A porção solúvel é particularmente rica em proteínas básicas neurotóxicas, mas apresenta também enzimas e diferentes substâncias orgânicas (lipídeos, carboidratos, nucleosídeos, peptídeos, nucleotídeos, aminoácidos livres) e inorgânicas (íons diversos) (MARCUSSEI *et al.*, 2011).

A fração solúvel usualmente consiste de mucopolissacarídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos, moléculas de baixo peso molecular, como serotonina ou histamina, inibidores de proteases, liberadores de histamina, aminoácidos livres. Em alguns tipos de peçonha, há ainda a presença de catecolaminas. Diferente da maioria de peçonhas de serpentes, muitas peçonhas escorpiônicas são geralmente desprovidas de atividade enzimática ou possuem baixos níveis de atividade enzimática, com exceção das hialuronidases (que têm o papel de “fator de espalhamento” na peçonha). Algumas espécies de escorpiões ainda possuem enzimas como fosfatase ácida, ribonucleases, acetilcolinesterases e fosfolipase A (em pequenas proporções),

angiotensinas e succinato-desidrogenases e diversas proteínas básicas de baixo peso molecular (neurotoxinas) (GWEE *et al.*, 1996; POSSANI *et al.*, 1999; GWEE *et al.*, 2002). Estas neurotoxinas são os componentes mais importantes da peçonha, sob o ponto de vista toxicológico, alterando a permeabilidade iônica de células excitáveis, através da interação específica com canais para íons de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Cl^- dependentes de voltagem, presentes nessas células, alterando o mecanismo de ativação dos mesmos e levando a intensa despolarização e liberação maciça de neurotransmissores (ISMAIL, 1995; POSSANI *et al.*, 1999), os quais são os responsáveis pelos efeitos fisiopatológicos do envenenamento.

Os canais para os íons de Na^+ , K^+ ou Ca^{+2} contribuem cada um de uma forma para o processo de transmissão em células excitáveis. Devido a sua importância em muitos aspectos da regulação celular e transdução de sinais, os canais iônicos dependentes de voltagem são alvos moleculares de uma grande diversidade de toxinas, incluindo as que alteram a cinética e a voltagem de sua ativação e inativação (CATTERALL *et al.*, 1986).

Toxinas que interagem seletivamente com canais para os íons de Na^+ , K^+ ou Ca^{+2} são ferramentas fundamentais para o entendimento da base molecular da excitabilidade elétrica (MARCUSI *et al.*, 2011).

Quatro diferentes famílias de toxinas foram descritas em venenos de escorpiões, as quais interagem especificamente com canais iônicos ligados à membrana. As toxinas que atuam em canais de sódio são classificadas em α e β . As toxinas escorpiônicas α ligam-se ao sítio 3 dos canais de sódio, diminuindo ou bloqueando o mecanismo de inativação destes canais. As toxinas do tipo β ligam-se ao sítio 4 e afetam a ativação do canal de sódio (CATTERALL, 1986; COURAUD *et al.*, 1982; JOVER *et al.*, 1980 a, b). Toxinas escorpiônicas que atuam em canais para sódio são os polipeptídeos tóxicos mais reativos presentes na peçonha de escorpiões e os principais responsáveis pelos efeitos neurotóxicos do envenenamento escorpiônico.

Os canais para potássio podem ser divididos em dois grandes grupos: os canais dependentes de voltagem e os dependentes de ligantes. Devido à alta seletividade para íons potássio e à ampla distribuição nos tecidos, os canais de potássio são muito importantes em vários processos fisiológicos, tais como excitabilidade celular, liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios,

regulação da secreção de fluidos e ativação de linfócitos (KACZOROWSKI; KOO, 1994).

O veneno de *T. serrulatus* é uma mistura de muitas substâncias, como toxinas, enzimas, fator de ativação de crescimento, que interagem com um grande número de proteínas e receptores, e esta interação determina um eventual efeito inflamatório. O envenenamento por escorpiões envolve a ativação da resposta inflamatória com subsequente liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores. Petricevich observou uma variedade de citocinas produzidas na ativação de células T e de macrófagos em envenenamentos (PETRICEVICH, 2004).

1.2 Ações de venenos sobre a resposta inflamatória e sobre células do sistema imune

1.2.1 Resposta inflamatória

Sabe-se que peçonhas de animais contêm diferentes componentes capazes de modular o sistema imunológico, causando respostas inflamatórias. A inflamação é um processo fisiopatológico que pode ser desencadeado por vários estímulos como agentes infecciosos, químicos, físicos, radiação ultravioleta, interação antígeno-anticorpo e resposta imune (HERSH; BODEY, 1970), levando a sinais moleculares e interações celulares (DALE *et al.*, 1993). Os eventos que ocorrem durante o processo inflamatório são desencadeados por diferentes mediadores presentes no plasma ou produzidos por células residentes ou por células recrutadas para o local da inflamação.

Se um agente agressor vence os primeiros sistemas de proteção com barreira naturais e penetra nos tecidos, ocorre a mobilização de diferentes tipos celulares associados a fenômenos vasculares caracterizando a reação inflamatória. Ela está envolvida em uma série de eventos, incluindo dilatação de artérias, capilares e vênulas, com aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo e exsudação de fluidos e proteínas do plasma. Esse processo se dá rapidamente, seguido por adesão de leucócitos no endotélio vascular, com subsequente influxo de células aos tecidos próximos ao local da agressão, ocasionando assim, o edema (FRANK; FRIES, 1991).

Os principais mediadores responsáveis pelo edema são a histamina, prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF); produtos do sistema

das cininas (ex. bradicinina), fatores do complemento (ex. C3a, C5a), fatores do sistema de coagulação e/ou sistema fibrinolítico (RIDKER *et al.*, 1997). Os mediadores responsáveis pelo acúmulo de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e linfócitos) nos tecidos, são o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8) e C5a (FACCIOLI *et al.*, 1990; FACCIOLI *et al.*, 1991; COLLINS *et al.*, 1993; BECK *et al.*, 1997; ALVES-FILHO *et al.*, 2008).

Pessini *et al.* (2003) demonstraram que o veneno bruto de *T. serrulatus* (VTs) e sua fração 1 (Ts1) pode induzir resposta inflamatória aguda quando inoculado na cavidade peritoneal de ratos, por mecanismo mediado por citocinas como IL-6, IL-1 α e TNF- α .

Bertazzi *et al.* (2005) mostraram que a incubação de soro humano normal e VTs induz migração de neutrófilos semelhante àquela induzida pela incubação com zimosan, utilizado classicamente como ativador do sistema complemento, mostrando que o veneno induz a quebra de C3 e C5, gerando os fragmentos ativos C3a e C5a.

1.2.2. Macrófagos e linfócitos

Macrófagos estão envolvidos em diferentes mecanismos homeostáticos e eventos patológicos, e podem estar envolvidos em interações complexas. Macrófagos estão envolvidos na fagocitose, liberação de enzimas, geração de radicais livres e mediadores de processos inflamatórios. A liberação de citocinas por macrófagos mostrou que a produção excessiva ou insuficiente pode contribuir significativamente para a fisiologia de uma série de doenças (PETRICEVICH; LEBRUN, 2005).

Estudos têm mostrado que o VTs pode ativar macrófagos que são parte essencial da resposta imune e desempenham papel fundamental na resposta humoral e celular (PETRICEVICH *et al.*, 2007).

Em resposta a peçonha, macrófagos secretam mediadores, tais como óxido nítrico (NO) e citocinas. As citocinas desempenham papel importante na resposta inflamatória (PETRICEVICH, 2004), e subsequentemente na ativação de outros tipos celulares, como os linfócitos.

Petricevich *et al.* (2008) relatam que oscilações nos níveis de cálcio são importantes fatores de regulação da viabilidade celular e para um bom funcionamento de todos os processos internos que ocorrem na célula. Demonstram também os efeitos das frações tóxicas FII e Ts1 do VTs, que induzem a oscilação

cíclica de cálcio intracelular, e a provável indução de mudanças permanentes na fisiologia de macrófagos.

Sands *et al.* (1989) concluíram que concentrações nanomolares da toxina *charybdotoxin* (CTX), componente do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, bloquearam os canais de potássio dependentes de voltagem em linfócitos T humanos. Os canais de sódio ocasionalmente expressos nessas células não foram afetados pela toxina (SANDS *et al.*, 1989).

Os linfócitos possuem diferentes canais iônicos, os quais são importantes para controlar a homeostase de cálcio e transdução de sinais nestas células. O funcionamento conjunto destes canais regula a ativação, mitogênese e volume celular de linfócitos. Em células T periféricas, quatro tipos de canais de potássio são encontrados: um canal dependente de voltagem, que é um membro da família *Shaker* e produto do gene Kv 1.3, e três pequenos canais distintos de potássio, ativados por cálcio. O subtipo Kv 1.3 tem sido muito estudado como promissor alvo farmacológico em doenças autoimunes (BEETON *et al.*, 2001; 2005; 2006). Bloqueadores de canais Kv 1.3 inibem a reação de hipersensibilidade retardada à tuberculina, indicando que esses canais poderiam ser alvos de agentes imunossupressores (MARCUSSE *et al.*, 2011). A inibição do canal Kv1.3 por inibidores peptídicos seletivos (por exemplo, *margatoxin*, isolada da peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus*) provoca despolarização da célula T humana, o que indica que a atividade deste canal controla o potencial de repouso da membrana plasmática dos linfócitos. A despolarização das células T bloqueia especificamente os canais dependentes de cálcio, que é a via de controle de produção de linfocinas e proliferação celular (KACZOROWSKI; KOO, 1994). Essa despolarização, por sua vez, leva a atenuação do aumento dos níveis de cálcio citoplasmáticos, observados na ativação de células T (KOO *et al.*, 1997)

Considerando que o VTs possui várias toxinas que atuam em canais de potássio (COLOGNA *et al.*, 2009), que poderiam afetar linfócitos, pretende-se avaliar os efeitos desta peçonha sobre funções específicas dessas células.

1.2.3 Citotoxicidade

As interações entre toxinas de venenos e leucócitos têm despertado interesse visto que se observa inflamação grave em pacientes picados por animais peçonhentos. Atividades citotóxicas de venenos têm sido relatadas e são atribuídas

a diversas enzimas e toxinas, tais como fosfolipase A₂, proteases, lectinas e cardiotoxinas (DU *et al.*, 2006).

O complexo de ataque à membrana (MAC) gerado pela ativação do SC foi primeiramente reconhecido pela sua habilidade de lisar células e causar morte celular; mais tarde foi observado que ele é capaz de ativar a inflamação induzindo neutrófilos a secretar leucotrienos, prostaglandinas e TNF- α , além de participar na modulação da apoptose e estimulação da proliferação celular (COLE; MORGAN, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Não foram encontrados relatos na literatura demonstrando associação direta do MAC a danos celulares induzidos por peçonhas de escorpiões; entretanto, a associação desses eventos foi sugerida por Ishikawa *et al.* (2004) para veneno de *Chrysaora quinquecirra*, medusa ou água-viva pertencente ao filo Cnidaria.

1.2.4 Ativação e proliferação celular

A ativação dos linfócitos T é o primeiro passo necessário no desenvolvimento de diversos eventos celulares, como citotoxicidade, apoptose, proliferação e ativação de células mononucleares e atividades biológicas associadas com ativação dessas células incluem expressão de marcadores de ativação e de receptores de citocinas na superfície celular, produção e secreção de citocinas e proliferação (COLLINS *et al.*, 2000).

Embora as células tanto do sistema imunológico inato como do sistema imunológico adaptativo comuniquem informações críticas através do contato célula-célula, muitas interações e respostas efetoras dependem da secreção de moléculas solúveis, as citocinas. Após a exposição ao antígeno, vertebrados respondem com a produção de anticorpos através de uma série de eventos envolvendo interações celulares múltiplas. Inicialmente, as células apresentadoras de antígenos são reconhecidas por receptores de antígenos específico de células T. No final, as células B produzem anticorpos que são capazes de reconhecer especificamente o antígeno que provocou a sua formação (PETRICEVICH, 2010). As duas subpopulações de células T helper, que são nomeadas Th1 e Th2, diferem principalmente no repertório de citocinas secretadas em resposta a estimulação antigênica (MOSMANN *et al.* 2005). Células tipo Th1 secretam principalmente interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) que são responsáveis pela ativação de macrófagos e promovem a resposta mediada por

células contra patógenos intracelulares invasores ou a presença de toxinas. Células Th1 também induzem a produção de anticorpos IgG2a opsonizantes (MOSMANN, 1989). A outra subpopulação, tipo Th2 é importantes na defesa contra parasitas extracelulares por indução de IgE e IgA e produção de uma variedade de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (MOSMANN, 1989). De acordo com suas ações ou propriedades as citocinas podem ser classificadas em pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF que são as principais responsáveis por iniciar uma defesa eficaz contra patógenos exógenos. No entanto, o excesso de produção desses mediadores pode levar a falência múltipla de órgãos e morte (PINSKY *et al.*, 1993). Citocinas anti-inflamatórias incluem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, são cruciais para a regulação do processo inflamatório e manutenção da homeostase para o funcionamento adequado dos órgãos vitais, mas a resposta anti-inflamatória excessiva pode também resultar na supressão da função imunológica (BONE, 1996).

A caracterização de citocinas na resposta pro e anti-inflamatória é essencial para a reparação estrutural e funcional do tecido lesado, mas a geração excessiva de sinais pró-inflamatórios pode agravar o dano tecidual por causa dos produtos derivados de células inflamatórias (PETRICEVICH, 2010).

As citocinas participam em muitos processos fisiológicos, incluindo a regulação da resposta imunológica e inflamatória (VAN DER MEIDE, 1996). É amplamente conhecido que citocinas são importantes para a regulação das respostas inflamatórias, bem com a geração de imunidade a patógenos (PETRICEVICH, 2005).

A interação de macrófagos e venenos causa secreção de uma variedade de citocinas. A peçonha de *T. serrulatus* está envolvida na imunomodulação e cada vez mais evidências em estudos animais mostram que o envolvimento da cascata inflamatória e liberação de citocinas desempenham papel importante na patogênese de muitos envenenamentos (PETRICEVICH, 2005).

A hipótese de que o VTs é capaz de exercer ações sobre macrófagos, foi formulada por Petricevich em 2005, mostrando que macrófagos murinos tratados com frações do VTs são estimulados a produzir citocinas pró-inflamatórias de fase aguda, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (PETRICEVICH, 2005).

Marcadores de ativação de linfócitos são glicoproteínas de superfície celular expressas como marcadores fenotípicos ou identificadores de diferentes estágios de maturação da célula. Moléculas envolvidas na ativação ou regulação de linfócitos B

incluem CD69 e CD40, e de linfócitos T incluem HLA-DR, CD25 e CD69. CD69 é um marcador de ativação precoce expresso em linfócitos B e T e células NK que aumenta na maioria das células hematopoiéticas após estimulação e pode ser detectado em até uma hora de estimulação de células T com mitógenos e antígenos purificados (ARVÅ; ANDERSSON, 1999). CD40 representa papel central na ativação e proliferação de células B, dependentes de célula T, via interação com ligante de CD40 (BISHOP; HOSTAGER, 2001). CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) é expresso em células T convencionais após estimulação e tem sido utilizado para definir subpopulações de células T regulatórias ou supressoras, importantes na manutenção da auto-tolerância imunológica (SAKAGUCHI, 2005). O anti-HLA-DR reconhece o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, expresso em linfócitos B, monócitos, macrófagos ativados, linfócitos T, células NK ativadas e células progenitoras humanas (BRODSKY, 1984; HOLLING; SCHOOTEN; VAN DEN ELSEN, 2004).

Portanto, ativação celular pode ser estudada analisando a cinética da expressão de marcadores de superfície após estimulação de células com diferentes substâncias. Adicionalmente, a imunofenotipagem de subpopulações de células linfóides tem sido útil para prever a imunotoxicidade de substâncias (BURCHIEL *et al.*, 1999), especialmente quando combinada a ensaios tradicionais que avaliam função celular. Assim, o emprego de ensaios de proliferação celular pode fornecer informações valiosas quanto à função de linfócitos cultivados na presença de diferentes estímulos.

Dentro do projeto temático “Toxinas animais: estrutura, função e aplicações biotecnológicas” (FAPESP processo nº 2005/54855-0), este estudo visa investigar a presença, na peçonha em questão, de substâncias com ação sobre diferentes funções de linfócitos. Esta investigação visa fornecer subsídios para a possível utilização da peçonha com fins terapêuticos, e como ferramentas para investigação dos mecanismos envolvidos nos processos patológicos que ocorrem em decorrência do envenenamento e também em outras doenças de caráter inflamatório.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral deste projeto é investigar os efeitos imunomoduladores da peçonha de *T. serrulatus* sobre funções de linfócitos T humanos.

2.2. Específicos

Os objetivos específicos deste estudo são investigar, usando sistemas *in vitro*, se o veneno de escorpião *T. serrulatus* é capaz de:

- exercer efeito citotóxico direto sobre células mononucleares humanas;
- modular o processo de proliferação dessas células;
- modular a expressão de marcadores fenotípicos e de ativação celular, incluindo CD25 (cadeia alfa do receptor de IL-2), CD69 e HLA-DR em linfócitos T e B.
- alterar a produção de citocinas, como IL-2, IL-6, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peçonha

A peçonha bruta de *Tityus serrulatus* foi fornecida pela Profa. Dra. Eliane Candiane Arantes Braga, do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP.

A peçonha escorpionica foi fracionada por centrifugação, obtendo-se uma fração solúvel (rica em proteína neurotóxicas, enzimas e substâncias orgânicas e inorgânicas) e uma fração insolúvel, não tóxica, constituída por mucoproteínas e restos de células (MURCUSSI *et al.*, 2011). Para o fracionamento, VTs liofilizado (4 mg) foi diluído em 10 mL de água destilada estéril, a solução foi centrifugada a 10.015xg por 30 minutos sob refrigeração, e em seguida a fração solúvel foi filtrada em membrana para esterilização (Millex 0,22 µm, Millipore, Bedford, EUA), previamente umedecida.

3.2 Casuística

Para avaliação de atividades imunomoduladoras sobre linfócitos, foram colhidas amostras de sangue (20 mL) de voluntários adultos de ambos os sexos, na faixa etária de 20 a 50 anos, pertencentes à comunidade da FCFRP (alunos, funcionários e docentes). Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP – USP) (Protocolo CEP/FCFRP nº 166) (Anexo A).

Os voluntários foram integrados ao projeto somente após avaliação dos seguintes critérios de exclusão: história de doenças infecciosas recentes, doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias crônicas; uso de medicamentos que pudessem interferir nos resultados da pesquisa, em especial anti-inflamatórios. Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), o sangue de cada voluntário foi colhido assepticamente, por punção venosa na veia cubital do braço em tubos para coleta a vácuo contendo heparina, após jejum de 8 h. Os riscos deste procedimento para os sujeitos foram mínimos, podendo ocorrer eventualmente pequeno desconforto devido à introdução da agulha para colher o sangue. Os materiais utilizados eram descartáveis, não havendo riscos de contaminação.

3.3 Modulação de eventos celulares por venenos

3.3.1 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Após a colheita do sangue, PBMC foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077) (Sigma

Diagnostics, Inc., Missouri, EUA). As células mononucleares foram lavadas a 4°C com RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, ressuspensas com 1mL de RPMI e ajustadas para 5×10^6 células/mL após verificação da viabilidade por exclusão do corante azul de tripan. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibiótico/antimicótico (Anexo C) a 37°C e 5% de CO₂ por diferentes períodos, na presença ou não de estímulo (PHA - fitohemaglutinina e LPS - lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, SIGMA, St. Louis, MO, EUA) e de diferentes concentrações da peçonha. As células foram recuperadas após 24h para imunofenotipagem e análise de marcadores de ativação por citometria de fluxo. Os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliqüotados e armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas. Todo o processo foi realizado em capela de fluxo laminar com material estéril e todos os reagentes utilizados foram autoclavados ou filtrados em membrana Millipore (Millex HV 0,45 µm, 25 mm diâmetro) para evitar contaminação das culturas.

3.3.2 Ensaio de Citotoxicidade utilizando o MTT

Para avaliar a atividade citotóxica do VTs foi utilizado o método de citotoxicidade descrito por Mosmann (1983). Este método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células permanecem vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (MTT) levando a redução desta molécula para originar o Azul de Formazan. Portanto, quanto maior a viabilidade celular em uma determinada amostra, mais Azul de Formazan é formado. O Azul de Formazan é solubilizado com dodecilsulfato de sódio (SDS). A leitura da quantidade de Azul de Formazan formado foi medida por espectrofotometria em 570 nm (Espectrofotômetro SpectraMax Plus – Molecular Devices, EUA). PBMC foram preparadas conforme item 3.3.1. As células foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 5×10^6 células por poço, tratadas com concentrações crescentes de peçonha diluída no mesmo meio de cultura por um período de 24h. Em seguida, 20µL do reagente MTT na concentração de 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e após quatro horas a 37°C, SDS a 20% foi adicionado para dissolver os cristais de formazan (MOSMANN, 1983). As absorbâncias foram lidas em 570nm e os resultados expressos em porcentagens de viabilidade, usando amostras incubadas somente com o meio de cultura RPMI 1640 completo (com soro

bovino fetal) como 100% do valor de viabilidade. A ciclofosfamida na concentração de 25 mg/mL foi utilizada como controle positivo (droga citotóxica).

3.3.3 Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo

A ativação de linfócitos é complexa, mas finamente regulada por uma cascata de eventos que resultam na expressão de várias moléculas de superfície celular, que conduzem a diferentes respostas imunes. A avaliação da natureza quantitativa e qualitativa das funções de linfócitos fornece informações valiosas sobre a resposta imune (REDDY *et al.*, 2004). Foram realizadas análises por citometria de fluxo para identificar e quantificar populações de linfócitos e avaliar a expressão de marcadores de ativação celular nas células previamente incubadas com diferentes concentrações da peçonha. Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD19 conjugados com FITC (*Fluorescein isothiocyanate*), anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 marcados com PE (*Phycoerythrin*), anti-CD25, anti-HLA-DR e anti-CD69 marcados com APC (*Allophycocyanin*) (Tabela 1). As células coletadas dos poços de cultura na concentração de 1×10^6 em 100 μ L de tampão de FACS (PBS-SBF-azida), foram incubadas com 1 μ L de anticorpos monoclonais por 30 minutos a 4°C no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em PBS-SBF-azida. Quando necessário as células foram incubadas *overnight* em PBS-formol (COLIGAN *et al.*, 1991). As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSCanto, Becton-Dickinson, Mountain View, CA, EUA) e os dados analisados pelo programa FACSDiva (Becton-Dickinson).

TABELA 1. Anticorpos monoclonais usados para identificar o tipo celular e diferentes marcadores de ativação

Tipo celular	FITC	PE	APC
Linfócitos T CD4	CD3	CD4	69/25/HLA-DR
Linfócitos T CD8	CD3	CD8	69/25
Linfócitos B	CD19	--	69/25/HLA-DR

Linfócitos T CD4 foram marcados com anti-CD3 FITC e anti-CD4 PE, com marcadores de ativação anti-CD69, anti-CD25 e HLA-DR; Linfócitos T CD8 foram marcados com anti-CD3 FITC e anti-CD8 PE, com marcadores de ativação anti-CD69, anti-CD25 e anti-HLA-DR; Linfócitos B foram marcados com anti-CD19 e com marcadores de ativação anti-CD69, anti-CD25 e anti-HLA-DR.

3.3.4 Ensaio de proliferação celular utilizando CFSE

CFSE (do inglês: 5-(and - 6) – *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) é um corante citoplasmático verde permeável a membrana que se difunde livremente dentro da célula. Após penetrar na célula, as duas cadeias laterais de acetato, responsáveis pela propriedade de permeabilização da membrana celular, são clivadas por esterases intracelulares, formando um composto original. Esta lenta velocidade de saída permite ao CFSE ligar-se covalentemente a moléculas intracelulares por longos períodos. O CFSE pode reagir potencialmente com uma ampla variedade de macromoléculas contendo amina dentro da célula. Muitos desses conjugados são de vida curta e podem atravessar a membrana plasmática, sendo perdidos nas primeiras 24h após marcação. Entretanto, quantidades suficientes de moléculas com marcação CFSE de vida longa são retidas dentro da célula sem afetar a função celular. Quando a célula se divide, as macromoléculas marcadas com CFSE são distribuídas entre as células-filhas. A intensidade de fluorescência de cada geração celular corresponde a metade da fluorescência da geração anterior (PARISH, 1999). O CFSE tem um comprimento de excitação de 491nm e de emissão de 518nm, podendo ser facilmente detectado por citometria de fluxo. Portanto, a marcação com CFSE é um método simples e sensível que permite examinar populações específicas de células proliferantes e identificar de 7 a 10 gerações celulares sucessivas.

O método de CFSE (Molecular Probes, EUA) foi utilizado para ensaio de proliferação *in vitro* de células mononucleares humanas (QUAH *et al.*, 2007). PBMCs foram obtidas como descrito no item 3.3.1 e a seguir, uma alíquota das células foi utilizada para marcação com CFSE, 5×10^5 cél./mL por poço, quantidade suficiente para incubar na presença ou não de estímulos (PHA e LPS) e de diferentes concentrações da peçonha. Células sem marcação foram utilizadas para controle do experimento (controle da marcação).

As células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS contendo 0,1% de albumina humana (máximo de $0,5-1,0 \times 10^7$ células/mL) e em seguida marcadas com 2,5 μ M de CFSE por 10 min a 37°C. A marcação foi imediatamente interrompida adicionando 5 volumes de RPMI contendo 10% de SBF gelado, e incubando por 5 minutos em gelo e no escuro. As células foram lavadas 3 vezes com 20 mL de RPMI 10% SBF e ressuspensas em RPMI 10% SBF na concentração desejada. Uma alíquota de células foi separada para verificar a intensidade de marcação das células com CFSE no dia 1 ($0,5 \times 10^6$), 12-18h após a marcação. As células foram ressuspensas a $0,5 \times 10^6$ /mL, plaqueadas em placa de 96 poços (200 μ L/poço) e cultivadas com diferentes quantidades de peçonha e controles adequados a 37°C

por 5 dias no escuro. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD3 conjugado com PerCP (*Peridinin-chlorophyll-protein complex*), anti-CD19, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD4, conjugados com PE, anti-CD25, anti-HLA-DR e anti-CD69 marcados com APC. As células coletadas dos poços de cultura na concentração de 1×10^6 em 100µL de tampão de FACS (PBS-SBF-azida), foram incubadas com 1µL de anticorpos monoclonais por 30 min a 4°C no escuro. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em PBS-SBF-azida. Quando necessário as células foram incubadas *overnight* em PBS-formol (COLIGAN *et al.*, 1991). As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSCanto, Becton-Dickinson, EUA) e os dados analisados pelo programa FACSDiva (Becton-Dickinson, EUA).

3.3.5 Ensaio de avaliação da produção de citocinas

Diferentes citocinas foram quantificadas no sobrenadante de culturas de PBMCs, na presença ou não de fitohemaglutinina (PHA) e de diferentes concentrações de VTs, utilizando o kit *Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/TH2/TH17 Cytokine* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Os padrões de citocinas liofilizados foram reconstituídos com o diluente do ensaio e diluições seriadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256 foram preparadas. *Beads* de captura específicas para cada uma das citocinas foram misturadas como recomendado. Para o ensaio, 35µL *beads*/tubo foram adicionados aos padrões e às amostras, seguidos por 25µL/tubo do reagente de detecção PE (mistura de anticorpos específicos para as citocinas marcados com ficoeritrina). Os tubos foram incubados por 3 h a temperatura ambiente no escuro. Após a incubação, 1 mL do tampão de lavagem foi adicionado a cada tubo e uma centrifugação a 200g por 5 min foi realizada. O sobrenadante foi descartado e as *beads* foram ressuspensas em 100µL de tampão de lavagem. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto e analisadas utilizando o software CBAanalysis (BD Biosciences).

3.4. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média dos experimentos realizados. A avaliação estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os últimos anos, uma grande variedade de ferramentas foram disponibilizadas para a identificação, purificação e caracterização de canais iônicos, com objetivo de entender sua estrutura e função. Estas ferramentas são diversificadas, tanto química quanto funcionalmente, e incluem grande número de polipeptídeos encontrados em peçonhas de alguns animais como escorpiões, aranhas e serpentes (DENAC *et al.*, 2000).

O veneno de escorpião consiste de um complexo de várias toxinas que apresentam uma ampla gama de propriedades biológicas (PETRICEVICK, 2005).

As toxinas são capazes de atuar sobre diferentes sistemas biológicos, inclusive o imunológico, hemostático, cardiovascular e neurológico. Uma grande variedade de estudos, utilizando toxinas de escorpião, resultou em contribuições significantes, principalmente os estudos para elucidação da estrutura e função de canais iônicos, bem como a compreensão dos efeitos de alguns mediadores neuroquímicos (BICALHO *et al.*, 2002; BOSMANS; MARTIN-EAUCLAIRE; TYTGAT, 2007).

Petricevich e colaboradores (2007) têm utilizado toxinas de escorpião como ferramentas de estudo para compreender o sistema imunológico e seus processos bioquímicos. Utilizando uma toxina da peçonha de *T. serrulatus*, denominada Ts1, verificaram que macrófagos expostos à toxina produziram maiores quantidades de vários mediadores. No que diz respeito às citocinas pró-inflamatórias, foi observado inicialmente aumento de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ e NO. Em contrapartida, os níveis mais elevados de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 foram observados mais tardiamente. Estes dados indicam que Ts1 tem um importante efeito imunomodulatório sobre macrófagos e acrescentam informações para a compreensão do quadro de envenenamento por escorpião.

Além de contribuir para esclarecer a modulação de canais iônicos, estudos demonstraram que o uso da peçonha bruta e toxinas isoladas pode auxiliar na compreensão da ação de diversos mediadores biológicos, como por exemplo, as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), citocinas (interleucinas), monoaminoácidos e óxido nítrico (MAGALHÃES *et al.*, 1999; PETRICEVICH; PENA, 2002; FUKURAMA *et al.*, 2003; PESSINI *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2007; PETRICEVICH *et al.*, 2007)

4.1 Ensaios de Citotoxicidade (MTT)

A medição da viabilidade e proliferação constitui a base de numerosos ensaios *in vitro* de uma população de células em resposta a fatores externos. A redução do sal tetrazólio é amplamente aceita como maneira confiável para analisar a proliferação celular (MOSMANN, 1983).

Sais de tetrazólio se tornaram ferramentas muito utilizadas em biologia celular para medir a atividade metabólica de células, incluindo as de mamíferos. Nessas células, estudos indicam que o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), é responsável pela maioria da redução do MTT e isso é corroborado por estudos com células inteiras. A redução do MTT está associada não apenas com mitocôndrias, mas também com o citoplasma e com as membranas não-mitocondriais, incluindo o compartimento endossomo/lisossomo e a membrana plasmática (BERRIDGE, 2005).

O ensaio de citotoxicidade foi o primeiro ensaio a ser realizado com a finalidade de obter uma faixa de concentração do veneno que apresentasse baixo ou nenhum efeito citotóxico às células mononucleares.

O VTs, nas concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/mL, provocou 12,7, 22,2 e 23,7%, respectivamente, de diminuição na porcentagem de viabilidade de PBMC em relação às células incubadas em meio RPMI após 24 h de cultura (Figura 1). Nas concentrações menores, contendo 100, 50 e 25 µg/mL de VTs, a diminuição da viabilidade foi de 3 a 7%. Com base nestes resultados, por apresentarem baixa toxicidade às PBMC, as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL foram selecionadas para uso nos ensaios subsequentes.

Estudos prévios com veneno bruto de *T. serrulatus in vitro* mostraram que a concentração de 50 µg/mL, testada em cultura de macrófagos, apresentou em torno de 5% de citotoxicidade às células (PETRICEVICH *et al.*, 2008).

Figura 1. Efeito do VTs na viabilidade de PBMC. As células foram expostas a diferentes concentrações do veneno por 24h e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio do MTT. A. Concentrações de 62,5 a 2000µg/mL; B. Concentrações de 12,5 a 100µg/mL. Dados apresentados em porcentagens de viabilidade, considerando células não tratadas como 100% viáveis (Células) (média $\pm$ erro-padrão da média - EPM). A ciclosporina (25mg/mL) foi utilizada como droga citotóxica (dg. cito). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em comparação às células não tratadas.

4.2 Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo

Atualmente existem inúmeras metodologias empregadas para quantificar a ativação e a proliferação celulares *in vitro*. A citometria de fluxo surge como uma metodologia atraente, pois permite a manutenção das condições vitais das células, favorecendo investigações mais aprofundadas (JUNIOR *et al.*, 2006).

A ativação de linfócitos é uma cascata de eventos complexa, mas finamente regulada, que resulta na expressão de várias moléculas de superfície celular, que conduzem a diferentes respostas imunes (REDDY *et al.*, 2004). A ativação fisiológica de linfócitos T é regulada pelo complexo do receptor de células T (TCR) / CD3 e co-receptores, tais como CD28 (JUNE *et al.*, 1990). A co-estimulação das células T através destes receptores ativa a proteína quinase C (PKC) e leva ao aumento do cálcio intracelular, um processo imitado por agentes farmacológicos, como o éster de forbol (acetato de forbol 12-miristato, PMA) (TRUNEH *et al.*, 1985). A fitohemaglutinina (PHA), outro mitógeno comumente usado, é uma lectina vegetal que se liga ao TCR, causando ativação dos linfócitos T (LICASTRO *et al.*, 1993).

Marcadores de ativação são moléculas celulares cuja expressão pode ser induzida em células T, B e NK, dentre outras, pelo estímulo provocado por patógenos durante processos infecciosos e inflamatórios ou por mitógenos.

O CD69 é um dos marcadores de superfície celular expressos mais precocemente, o qual pode ser detectado em uma ou duas horas e sua expressão pode persistir por pelo menos três dias. A expressão do CD69 pode ser induzida na maioria das células hematopoéticas (ZIEGLER; RAMSDELL; ALDERSON, 1994).

O CD25, a cadeia α do receptor de IL-2, é um marcador de ativação tardio, induzido durante a ativação da célula linfóide, alcançando pico de expressão 96 horas após estímulo com PHA. É expresso em células T, B e monócitos ativados.

O HLA-DR, antígeno do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) humano de classe II, é expresso em células B, monócitos, macrófagos e aparece durante a fase tardia de ativação de células T e NK ativadas.

Células que expressam esses diferentes marcadores de ativação, bem como marcadores fenotípicos, que definem subpopulações celulares podem ser enumeradas por citometria de fluxo.

A Figura 2 mostra um exemplo de seleção de regiões (*gates*) correspondentes a diferentes subpopulações de células T por meio de citometria de fluxo, empregando anticorpos monoclonais anti-CD3-FITC e anti-CD8-PE. Nesse exemplo, a região denominada P2 corresponde aos linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+), enquanto a região P3 engloba todos os outros linfócitos (células CD3+), negativos para o marcador fenotípico CD8. A estimulação com fitohemaglutinina (PHA), um ativador policlonal de células T classicamente utilizado, produziu uma expansão da população de células T CD8+ (Fig. 2B).

Figura 2 - *Dot plots* representando a seleção de regiões (*gates*) correspondentes aos linfócitos T citotóxicos (P2, células CD3+/CD8+) e aos demais linfócitos T (P3, células CD3+/CD8 negativas). Gráficos mostram perfis representativos de células cultivadas por 24 h com meio RPMI (A - controle negativo) ou com fitohemaglutinina (PHA) (B - controle positivo), após marcação com anticorpos monoclonais anti-CD3-FITC e anti-CD8-PE. Nota-se expansão da população de células na região P2 no controle positivo.

Para avaliar os efeitos do VTs no fenótipo das PBMC, bem como suas ações na expressão dos marcadores de ativação, as células foram cultivadas por 24h na presença de diferentes concentrações do VTs e os marcadores fenotípicos e de ativação foram quantificados por citometria de fluxo.

Não houve diferenças significativas nas porcentagens de linfócitos T e B cultivados na presença do VTs (dados não mostrados). Também, não foram observadas diferenças significativas nas porcentagens de linfócitos T CD4⁺ (Figs. 3A, 3B e 3C) e T CD8⁺ (Figs. 4A, 4B e 4C) expressando marcadores de ativação CD69, CD25 e HLA-DR (linfócitos ativados).

Figura 3 – Efeito do VTs na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ expressando CD69 (A), CD25 (B) e HLA-DR (C). Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 céls/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de diferentes concentrações do VTs. Após 24 h, as células foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à expressão dos marcadores CD25, CD69 e HLA-DR, por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE e anti-CD25/CD69/HLA-DR-APC. Controle: células incubadas com meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2µg/mL); 100, 50 e 25: células incubadas com 100, 50 e 25µg/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 7 experimentos. *** $p < 0,001$ em comparação ao controle.

Figura 4 – Efeito do VTs na porcentagem de linfócitos T CD8⁺ expressando CD69 (A), CD25 (B) e HLA-DR (C). Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 céls/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de diferentes concentrações do VTs. Após 24 h, as células foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à expressão dos marcadores CD25, CD69 e HLA-DR, por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos anti-CD3-FITC, anti-CD8-PE e anti-CD25/CD69/HLA-DR-APC. Controle: células incubadas com meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2µg/mL); 100, 50 e 25: células incubadas com 100, 50 e 25µg/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 7 experimentos. *** $p < 0,001$) em comparação ao controle.

Considerando que alguns marcadores de ativação, especialmente CD25 e HLA-DR, atingem seus picos de expressão mais tardiamente, formula-se a hipótese de que o tempo de cultura utilizado não tenha sido suficiente para permitir a observação de diferenças significativas nas porcentagens de células ativadas. Novos experimentos serão necessários, utilizando tempos de cultura mais longos, para que essa hipótese seja confirmada ou não. Ainda, concentrações maiores do VTs deverão ser empregadas para melhor avaliação de suas ações na expressão de marcadores celulares em linfócitos.

4.3 Análise dos ensaios de proliferação de linfócitos

Linfócitos são incapazes de proliferar espontaneamente em cultura, por isso as células foram tratadas previamente com PHA que é capaz de ativar linfócitos T, um procedimento preliminar *in vitro* em que a proliferação foi induzida, sem especificidade antigênica. A estimulação de linfócitos por antígenos em meio de cultura causa respostas *in vitro* que possuem muitas das características das respostas imunológicas induzidas em condições fisiológicas *in vivo* (ABBAS, 2008).

A PHA é um potente mitógeno para linfócitos T, estimulando a divisão celular por mecanismos que tem sido intensivamente estudados. O envolvimento de canais iônicos em um estágio inicial de ativação pela PHA é sugerido por relatos de despolarização e hiperpolarização de membranas, de elevação do fluxo de íons através da membrana e de aumento de cálcio livre intracelular. A ação primária da PHA pode estar fundamentada no aumento das constantes de velocidade dependentes de voltagem, que leva a abertura de canais de K^+ . O efeito rápido da PHA nesses canais, juntamente com a inibição da incorporação de 3H -timidina por bloqueadores de canais de K^+ , sugerem que o funcionamento alterado desses canais pela PHA pode levar a uma sequência de eventos celulares e moleculares culminando com a síntese de DNA (DECOURSEY *et al.*, 1984).

Os canais de íons de K^+ são macromoléculas embutidas em membranas, onde desempenham papel fundamental na excitabilidade celular e nas vias de transdução de sinais (RODRIGUES DE LA VEGA *et al.*, 2003).

Os linfócitos possuem uma infinidade de canais iônicos distintos, cujas atividades são importantes para controlar a homeostasia do cálcio e os processos de transdução de sinais nessas células. O funcionamento em conjunto destes canais iônicos regula a ativação de linfócitos, mitogênese e volume celular. Em células T

periféricas humanas, quatro tipos de canais de potássio são encontrados: um canal dependente de voltagem, que é membro da família Shaker e produto do gene Kv1.3, e três pequenos canais para potássio ativados por cálcio. A inibição do canal Kv1.3 por inibidores peptídicos seletivos (por ex. margatoxina) causa despolarização das células T humanas, indicando que a atividade deste canal controla o potencial de repouso da membrana plasmática dos linfócitos. A despolarização das células bloqueia especificamente vias dependentes de cálcio, que controlam a produção de citocinas e a proliferação celular (KACZOROWSKI; KOO, 1994).

O método da carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE ou CFDA-SE) é um meio eficaz e popular para monitorar linfócitos em proliferação. O CFSE rotula covalentemente moléculas intracelulares com o corante fluorescente, a carboxifluoresceína. Assim, quando uma célula se divide e está marcada com CFSE, as células-filhas são dotadas da metade do número de moléculas marcadas com carboxifluoresceína. Portanto, cada divisão celular pode ser avaliada medindo a diminuição correspondente na fluorescência celular, por citometria de fluxo (QUAH; PARISH, 2010). A divisão celular pode ser medida com precisão por causa de uma combinação de três fatores: a reprodutibilidade, eficiência e estabilidade da marcação de proteínas citoplasmáticas com CFSE, resultando em um sinal excepcionalmente brilhante e uniforme, que é dividido entre as filhas com alta fidelidade (FAZEKAS *et al.* 1999).

Este método, portanto, foi selecionado para investigar os efeitos do VTs na proliferação de PBMC humanas *in vitro*. A associação de anticorpos monoclonais que reconhecem os diferentes tipos celulares com anticorpos contra marcadores de ativação permitiu, ainda, que se avaliasse a porcentagem de células ativadas e diferenças na proliferação de diferentes populações de células ativadas.

Inicialmente, foram realizados ensaios com o intuito de padronizar o tempo de cultura em que a proliferação de linfócitos estimulados com PHA (2µg/mL) fosse alta. Observou-se maior proliferação de linfócitos nos tempos de 72 e 96 horas de cultivo. Assim, o tempo de cultivo escolhido para os experimentos subsequentes foi de 96 horas de incubação (Fig. 5).

Figura 5 – Porcentagem de proliferação de linfócitos em diferentes períodos de incubação. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE ($2,5 \mu\text{M}$) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de fitohemaglutinina ($2 \mu\text{g/mL}$). Após 16, 24, 48, 72 e 96 h, as células foram recuperadas da cultura e avaliadas quanto a intensidade de marcação com CFSE, por citometria de fluxo. Controle: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura na presença de PHA ($2 \mu\text{g/mL}$). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. *** $p < 0,001$ em comparação ao controle.

Histogramas representativos de um experimento de proliferação de PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com PHA em diferentes tempos de cultivo são mostrados na Figura 6. Os picos observados na região P19 (Figs. 6D e 6F, histogramas em azul) correspondem a diferentes ciclos de divisão celular na população de linfócitos, após 72 e 96h de cultivo, respectivamente.

C

D

E

Figura 6 – *Dot plots* e histogramas representativos de um ensaio de proliferação de PBMC utilizando CFSE. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cells/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 μ M) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de fitohemaglutinina (2 μ g/mL). Células foram recuperadas após cultivo por 16 (A), 24 (B), 48 (C), 72 (D) e 96 h (E) e avaliadas quanto a intensidade de marcação com CFSE. As regiões P19 representam os perfis de divisão de linfócitos.

Após a padronização do tempo, foram realizados ensaios para avaliar a porcentagem de linfócitos e a porcentagem de proliferação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ na presença de PHA ou de diferentes concentrações de VTs. Considerando que canais iônicos representam papel importante na proliferação celular induzida pela PHA (DECOURSEY et al., 1984) e que o VTs contem toxinas que reagem com esses canais (COLOGNA et al., 2009), também foi avaliado o efeito, nas células, da presença concomitante do VTs e da PHA.

Observou-se uma tendência à inibição da porcentagem de linfócitos T CD8⁺ induzidos pela PHA quando as culturas foram tratadas concomitantemente com PHA e concentrações variadas de veneno bruto (100, 50 e 25µg/mL) (Figs. 7 e 8).

Figura 7 - Porcentagem de linfócitos T CD3⁺ CD8⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 µM) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD3 e CD8 utilizando anticorpos anti-CD3-PerCP e anti-CD8-PE. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2µg/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25µg/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25µg/mL do VTs. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 5 experimentos.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas quando a média dos experimentos é utilizada (Fig. 7), nos histogramas mostrados na Figura 8, representativos de um experimento, nota-se claramente a inibição da proliferação de linfócitos T CD8⁺ induzida pela PHA na presença do VTs (comparar região P8 do painel B com a mesma região nos painéis F, G e H).

A) Células sem marcação

B) PHA

C) 100µg/mL

D) 50µg/mL

E) 25µg/mL

F) PHA+100µg/mL

G) PHA+50µg/mL

H) PHA+50µg/mL

Figura 8 - Histogramas representativos de um ensaio de proliferação de linfócitos $CD3^+CD8^+$ em diferentes períodos de cultivo. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 µM) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA (2µg/mL), VTs ou ambos. Após 96 h, as células foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE. A) células sem marcação; B) células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura na presença de PHA. C, D e E) células marcadas com CFSE e incubadas com 100, 50 ou 25µg/mL do VTs, respectivamente; F, G e H) células marcadas com CFSE e incubadas com PHA e 100, 50 ou 25µg/mL do VTs, respectivamente.

O VTs, por si só, não estimulou a proliferação de linfócitos T CD3⁺CD8⁺, nas diferentes concentrações utilizadas (Fig. 9). Novamente, observou-se tendência à inibição dose-dependente, quando as células foram tratadas concomitantemente com PHA e concentrações variadas de VTs (100, 50 e 25µg/mL) (Fig. 9).

Figura 9 - Proliferação de linfócitos T CD3⁺ CD8⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 µM) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD3 e CD8 utilizando anticorpos anti-CD3-PerCP e anti-CD8-PE. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2µg/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25µg/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25µg/mL do VTs. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 5 experimentos.

Para a avaliação das porcentagens de linfócitos T CD8⁺ ativados (linfócitos T citotóxicos ativados), selecionou-se o marcador CD25, pois é um marcador tardio, induzido durante a ativação da célula linfóide, alcançando pico de expressão após 96 horas de estímulo com PHA.

Células PBMC foram estimuladas com PHA e a presença concomitante do VTs nas concentrações de 100, 50 e 25µg/mL inibiu a porcentagem de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ em 53,5, 45,5 e 35,7%, respectivamente. Diferenças significativas foram observadas para as concentrações de 100 e 50 µg/L (Fig. 10).

Figura 10 - Porcentagem de linfócitos T CD8⁺ expressando CD25⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 μ M) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD8 e CD25 utilizando anticorpos anti-CD8-PE e anti-CD25-APC. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2 μ g/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25 μ g/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25 μ g/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos. * $p < 0,05$ em comparação à PHA.

Quando a proliferação de linfócitos T CD8⁺ CD25⁺ foi avaliada, observou-se uma tendência do veneno de *T. serrulatus* em inibir a proliferação induzida pela PHA, porém os resultados não foram estatisticamente significativos (Fig. 11).

Figura 11 – Proliferação de linfócitos T CD8⁺ expressando CD25⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 μ M) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD8 e CD25 utilizando anticorpos anti-CD8-PE e anti-CD25-APC. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2 μ g/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25 μ g/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25 μ g/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 4 experimentos.

Não foram observadas diferenças significativas nas porcentagens de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (Fig. 12), na proliferação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (Fig. 13), na porcentagem de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ (linfócitos T *helper* ativados) (Fig. 14) e na proliferação de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ (Fig. 15), quando se compararam as células estimuladas com PHA e as células tratadas concomitantemente com PHA e VTs em diferentes concentrações.

Figura 12 - Porcentagem de linfócitos CD3⁺ CD4⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 μ M) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD3 e CD4 utilizando anticorpos anti-CD3-PerCP e anti-CD4-PE. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2 μ g/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25 μ g/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25 μ g/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos.

Figura 13 - Proliferação de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 μ M) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD3 e CD4 utilizando anticorpos anti-CD3-PerCP e anti-CD4-PE. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2 μ g/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25 μ g/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25 μ g/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 4 experimentos.

Figura 14 - Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 μ M) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD4 e HLA-DR utilizando anticorpos anti-CD4-PE e anti-HLA-DR-APC. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2 μ g/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25 μ g/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25 μ g/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos.

Figura 15 - Proliferação de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram marcadas com CFSE (2,5 μ M) e cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA e de diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus*. Após 96 h, as células incubadas com veneno, PHA ou ambos, foram recuperadas das culturas e avaliadas quanto à intensidade de marcação com CFSE e expressão dos marcadores CD4 e HLA-DR utilizando anticorpos anti-CD4-PE e anti-HLA-DR-APC. CFSE: células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, células estimuladas com fitohemaglutinina (2 μ g/mL); 100, 50, 25: células incubadas com 100, 50 e 25 μ g/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: células incubadas com PHA e concentrações de 100, 50 ou 25 μ g/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos.

4.4 Análise dos ensaios de produção de citocinas

As citocinas participam em muitos processos fisiológicos, incluindo a regulação da resposta imunológica e inflamatória. Estas moléculas efetoras são produzidas transitoriamente e localmente, controlando a amplitude e a duração da resposta (VAN DER MEIDE; SCHELLEKENS, 1996). São proteínas secretadas pelas células da imunidade que medeiam muitas funções dessas células.

As citocinas são produzidas em resposta a microrganismos e outros antígenos, e diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação. Na fase de ativação das respostas imunes adquiridas, as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação de linfócitos, e nas fases efetoras da imunidade natural e adquirida, elas ativam diferentes células efetoras para eliminar microrganismos e outros antígenos (ABBAS, 2008). É amplamente reconhecido que citocinas são um grupo de diversas proteínas, importantes para a regulação das respostas inflamatórias, bem como para a geração de imunidade para patógenos.

Petricevich *et al.* (2005), observaram a interação de macrófagos e o VTs, onde ocorreu a secreção de uma variedade de citocinas. O VTs está envolvido na imunomodulação, embora o mecanismo para essa atividade ainda não foi completamente elucidado. Mostram ainda que os macrófagos tratados com frações do veneno de *T. serrulatus* são estimulados a produzir citocinas pró-inflamatórias de fase aguda, como TNF, IL-1, e IL-6, mas de forma não tóxica (PETRICEVICH, *et al.*, 2005).

Os níveis de IL-1 no soro de humanos e camundongos injetados com veneno e/ou toxinas da peçonha de *T. serrulatus* são caracterizados por um rápido aumento desta citocina pró-inflamatória. Altos níveis dessas citocinas foram observados em sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongo expostos ao VTs e suas principais toxinas (PETRICEVICH, 2007 e 2008).

Muito pouco é conhecido sobre a ação desse veneno na produção de citocinas por PBMC humanos, sendo a maioria dos estudos realizados com macrófagos.

Para quantificar os níveis de citocinas nos sobrenadantes de culturas de PBMC, foi utilizado o Kit CBA (*Cytometric Bead Array*) Th1/Th2/Th17, que dosa várias citocinas em uma mesma amostra. Foram dosadas citocinas presentes no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico cultivadas

na presença de PHA e/ou diferentes concentrações de VTs. Após 96 horas de cultivo, as células foram recuperadas e os sobrenadantes foram armazenados a -80°C e no momento oportuno as dosagens foram realizadas.

VTs estimulou a produção de IL-2 de maneira dose dependente, embora não tenha sido estatisticamente significativo. Interessantemente, quando o veneno foi adicionado concomitantemente com a PHA, a produção de IL-2 foi abolida (Fig.16). Níveis muito baixos de IL-2 foram detectados após estímulo com PHA, como previamente reportado por Reddy et al. (2004).

Figura 16 – Efeito do VTs nos níveis de IL-2. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA ($2 \mu\text{g/mL}$), diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus* ou ambos. Os sobrenadantes da cultura de 96h foram utilizados para a quantificação da citocina por citometria de fluxo (CBA - Cytometric Bead Array). Controle: sobrenadante de células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, sobrenadante da cultura de células estimuladas com fitohemaglutinina; 100, 50, 25: sobrenadantes da cultura de células incubadas com 100, 50 ou $25 \mu\text{g/mL}$ do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: sobrenadante da cultura de células incubadas com fitohemaglutinina e concentrações de 100, 50 ou $25 \mu\text{g/mL}$ do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos.

IL-4 é uma citocina capaz de influenciar a diferenciação das células T *helper*. A citocina IL-4 foi quantificada neste trabalho, porém a PHA não induziu sua produção. Células incubadas com VTs e/ou PHA não apresentaram alterações na produção da mesma (dados não mostrados).

Altos níveis de IL-6 foram observados em soros de camundongos expostos aos venenos de *Centruroides noxius* e *T. serrulatus* (MAGALHÃES, 1999). Na dosagem desta interleucina, observou-se que o veneno de *T. serrulatus* nas

concentrações de 100 e 50 µg/mL induziu aumento nos níveis da IL-6 ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). O perfil observado sugere que o aumento na produção desta citocina depende da dose do veneno (Fig. 17).

Os níveis de IL-6 não foram alterados quando a PHA foi associada as diferentes concentrações do veneno de *T. serrulatus*, quando comparado com o tratamento isolado com a PHA.

Figura 17 – Efeito do veneno bruto de *Tityus serrulatus* nos níveis de IL-6. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA (2 µg/mL), diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus* ou ambos. Os sobrenadantes da cultura de 96h foram utilizados para a quantificação da citocina por citometria de fluxo (CBA - Cytometric Bead Array). Controle: sobrenadante de células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, sobrenadante da cultura de células estimuladas com fitohemaglutinina; 100, 50, 25: sobrenadantes da cultura de células incubadas com 100, 50 ou 25 µg/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: sobrenadante da cultura de células incubadas com fitohemaglutinina e concentrações de 100, 50 ou 25 µg/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) em relação ao controle.

Venenos de escorpiões podem estimular o eixo neuroendócrino-imunológico devido a sua capacidade de liberação de catecolaminas, corticosteróides, bradicinina e prostaglandinas e todos esses agentes induzem a liberação de mediadores imunológicos, citocinas (PETRICEVICH, 2010).

No soro de pacientes envenenados pelo escorpião *T. serrulatus* e de animais experimentais expostos ao veneno dos escorpiões *Androctonus australis hector*, *Centruroides noxius*, and *T. serrulatus* foram observados modificações nos níveis de IL-10 (PETRICEVICH, 2010).

O VTs nas concentrações de 100, 50 e 25µg/mL, utilizadas nos experimentos, não induziram a produção de IL-10. A concentração de 100µg/mL parece inibir a produção desta citocina induzida pela PHA, embora a diferença não seja estatisticamente significativa (Fig.18).

Figura 18 – Efeito do veneno bruto de *Tityus serrulatus* nos níveis de IL-10. Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA (2µg/mL), diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus* ou ambos. Os sobrenadantes da cultura de 96h foram utilizados para a quantificação da citocina por citometria de fluxo (CBA - Cytometric Bead Array). Controle: sobrenadante de células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, sobrenadante da cultura de células estimuladas com fitohemaglutinina; 100, 50, 25: sobrenadantes da cultura de células incubadas com 100, 50 ou 25µg/mL do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: sobrenadante da cultura de células incubadas com fitohemaglutinina e concentrações de 100, 50 ou 25µg/mL do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos. ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

Petricevich relata que altos níveis de TNF- α foram observados no soro humano, em ratos e também em sobrenadante de cultura de macrófagos de camundongos. Altos níveis de INF- γ foram observados e documentados durante o envenenamento causado em animais experimentais e humanos por diferentes venenos de escorpião *Centruroides noxius* e *T. serrulatus* (PETRICEVICH, 2002, 2006 e 2010).

O VTs nas concentrações de 100 e 50µg/mL quando adicionadas com PHA parecem inibir a produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF) induzida pela PHA (Fig.19A).

Observou-se uma tendência do veneno bruto de *T. serrulatus* em inibir a produção de interferon- γ (INF- γ) quando as células são tratadas concomitantemente com PHA (Fig. 19B).

Figura 19 – Efeito do veneno bruto de *Tityus serrulatus* nos níveis de TNF(A) e IFN- γ (B). Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6 cels/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços na presença de PHA ($2 \mu\text{g/mL}$), diferentes concentrações de veneno bruto de *T. serrulatus* ou ambos. Os sobrenadantes da cultura de 96h foram utilizados para a quantificação das citocinas por citometria de fluxo (CBA - *Cytometric Bead Array*). Controle: sobrenadante de células marcadas com CFSE incubadas em meio de cultura; PHA: controle positivo, sobrenadante da cultura de células estimuladas com fitohemaglutinina; 100, 50, 25: sobrenadantes da cultura de células incubadas com 100, 50 ou $25 \mu\text{g/mL}$ do VTs; PHA+100, PHA+50, PHA+25: sobrenadante da cultura de células incubadas com fitohemaglutinina e concentrações de 100, 50 ou $25 \mu\text{g/mL}$ do VTs. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. de 5 experimentos.

Tomados conjuntamente, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a peçonha de *T. serrulatus* é uma fonte potencial de substâncias com ações imunomoduladoras sobre linfócitos T humanos e estimulam novas investigações para o esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos, incluindo estudos que considerem a participação dos canais iônicos de linfócitos T nos fenômenos observados. Essas investigações, juntamente com a identificação dos componentes do veneno responsáveis pelas atividades observadas, poderão contribuir para a descoberta de ferramentas para estudo dos mecanismos fisiopatológicos do envenenamento, bem como para a descoberta de novas alternativas de tratamento para doenças mediadas pelo sistema imune.

5. CONCLUSÃO

1. Concentrações de 500, 1000 e 2000 µg/mL do VTs apresentaram citotoxicidade baixa a moderada para PBMC. Concentrações menores não foram citotóxicas. Com base nesses resultados, as concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL foram utilizadas nos ensaios subsequentes.
2. As concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL do VTs não alteraram significativamente as subpopulações de linfócitos e não modificaram a expressão de marcadores de ativação em linfócitos T CD4+, CD8+ e B, após 24h de cultivo.
3. Os resultados sugerem que o VTs inibe a proliferação de linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (PHA), e em especial a porcentagem de linfócitos T CD8+CD25+ (linfócitos T citotóxicos ativados). O VTs, isoladamente, não induziu proliferação celular.
4. VTs adicionado isoladamente à cultura de PBMC, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, induziu a produção de IL-6, uma citocina pró-inflamatória que desempenha papéis importantes nas respostas imunes inata e adaptativa. A secreção aumentada de IL-6, portanto, não está vinculada a aumento na proliferação celular. A presença do VTs concomitantemente à PHA apresentou tendência para inibição da produção das citocinas IL-10, TNF e IFN-γ por células estimuladas com a PHA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. **Editora Elsevier**. 6ª edição, 2008.

ALVES-FILHO, J.C.; DeFREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**. Augusta. v.1, p. 3-9, 2008.

ARVÅ, E.; ANDERSSON, B.; Kinetics of cytokine release and expression of lymphocyte cell-surface activation markers after *in vitro* stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with *Streptococcus pneumoniae*. **Scand. J. Immunol.** Oxford, v.49, p.237-243, 1999.

BARRAVIERA, B.; Venenos animais: uma visão integrada. Ed. De Publicações Científicas. Rio de Janeiro. p. 135-299, 1994.

BECK, L.A.; DAIKE, S.; LEIFERMAN, K.M.; HAMINTON, R.; ROSEN, H.; BOCHNER, B.S.; SCHLEIMER, R.P. Cutaneous injection of Rantes causes eosinophil recruitment comparison of no allergic and allergic human subjects. **J. Immunol.** Baltimore, v. 159, p. 2962-72, 1997.

BEETON, C.; WULFF, H.; BARBARIA, J.; CLOT-FAYBESSE, O.; PENNINGTON, M.; BERNARD, D.; CAHALAN, M.D.; CHANDY, K.G.; BÉRAUD, E. Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channel ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.98 p. 13942-13947, 2001.

BEETON, C.; PENNINGTON, M.; WULFF, H.; SINGH, S.; NUGENT, D.; CROSSLEY, G. Targeting effector for therapy of autoimmune diseases. **Mol. Pharmacol.**, Washington, v. 67, p. 1369- 1381, 2005.

BEETON, C.; WULFF, H.; STANDIFER, N.E.; AZAM, P.; MULLEN, K.M.; PENNINGTON, M.W. *et al.* Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 17414-17419, 2006.

BERTAZZI, T.D.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; TALHAFFERRO, V.L.; AZZOLINI, A.E.C.S.; CROTT, L.S.P.; ARANTES, E.C. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Int. Immunopharmacol.** Amsterdam, v.5, p.1077-1084, 2005.

BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Annu. Rev.** Nova Zelândia, v.11, p. 127-52, 2005.

BICALHO, A.F.; GUATIMOSIN, C.; PRADO, M.A.; GOMEZ, M.V.; ROMANO-SILVA, M.A. Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. **Neuroscience**, Oxford, v.113, p.115-123, 2002.

BISHOP, G.A.; HOSTAGER, B.S. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.** London, v.13, p.278-285, 2001.

BONE, R.C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Ann. Int. Med.** Philadelphia, v.125, n° 8, p.680-687,

BOSMANS, F.; MARTIN-EAUCLAIRE, M.F.; TYTGAT, J. Differential effects of five "classical" scorpion β -toxins on rNav1.1a and DmNav1 provide clues on species-selectivity, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.218, p.45-51, 2007.

BRODSKY, F.M. A matrix approach to human class II histocompatibility antigens: reactions of four monoclonal antibodies with the products of nine haplotypes. **Immunogenetics**. v.19, p.179-194, 1984.

BUCHERL, W. Acúleos que matam. **Revista dos Tribunais**. São Paulo, 153p., 1979.

BURCHIEL, S.W. et al. Uses and future applications of flow cytometry in immunotoxicity testing. **Methods**, San Diego, v.19, p.28-35, 1999.

CARDOSO, J.L.; FAN, W.H.R.; ARAUJO, A.A.; SANTALUCIA, M.; LOPES, J.M.; Óbitos por escorpionismo no Brasil (1990-1993). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Rio de Janeiro, v.28, p.10,1995.

CARDOSO, J.L.C. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Editora Sarvier**. p.182,198,334-341,356. 2003

CATTERALL, W.A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. **Ann. Rev. Biochem.** Palo Alto, v.55 p.953-985, 1986.

COELHO F.M.; PESSINI, A.C.; COELHO, A.M. et al. Platelet activating fator receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, Oxford, v.50, p.420-427, 2007.

COLE, D.S.; MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clin. Sci.**, London, v.104, p.455-466, 2003.

COLIGAN, J. E.; KRUISBEEK, A. M.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W. **Current protocols in immunology**. Boston: John Wiley & Sons, Inc., 1991.

COLLINS, P.D.; WEG, V.B.; FACCIOLI, L.H.; WATSON, M.L.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, T.J. Eosinophil accumulation induce by IL-8 in the guinea-pig in vivo. **Immunology**. Oxford, v. 79, p. 312-18, 1993.

COLLINS, D.P. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. **J. Immunol Methods**, Amsterdam, v.243, p.125-145, 2000.

COLOGNA, C.T.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein Pept. Lett.** Hilversum, v.16, p.920-932, 2009.

COURAUD, F.; JOVER, E.; DUBOIS, J.M.; ROCHAT, H. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potencial sodium channel. **Toxicon**. Oxford, v.20, p.9-16, 1982.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.; OLIVEIRA, J.S.M.; HERING, S. Severe scorpion envenomation in Brazil. Clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v.36, p.67-76, 1994.

CUPO, P.; OLIVEIRA, J.S.M.; FIGUEREDO, F; VAZARRA, D.K.; HERING, S.E. Escorpionismo in los región de Ribeirão Preto. São Paulo Brasil. Óbitos ocurridos in CONGRESSO LATINO AMERICANO DE TOXICOLOGIA, 10; La Havana, Cuba. Livro Resumo, La Havana. Associação Latino-Americana de Toxicologia, p.175, 1998.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.; HERING, S. In *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.h., Málaque, C.M.S., Haddad Jr, V., Ed. Sarvier, São Paulo, p.198-208, 2003.

DALE, M.M.; FAREMAN, J.C.; FAN, T.P.D. Textbook of immunopharmacology, 3 ed. **Blackwel Scientific Publications**. Oxford, p.269-276, 1993.

DENAC, H.; MEVISSEN, M.; SCHOLTYSIK, G. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 32, p. 453-479, 2000.

DECOURSEY, T.E.; CHANDY, K.G.; GUPTA, S.; CAHALAN, M.D. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? **Nature**. California, v.307 p. 465-468, 1984.

DU, X.Y., SIM, D.S., LEE, W.H., ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells Mol. Dis.** La Jolla, v.36, p.414-421, 2006.

FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. **Agents Actions**, Basel, v. 30, p. 344-49, 1990.

FACCIOLI, L.H.; NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F.M.; SEHMI, R.; KAY, A.B.; WILLIAMS, T.J. The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammation mediators, *in vivo*. **Immunology**, Oxford, v.73, p.222-7, 1991.

FAZEKAS DE ST G.; SMITH, A.L.; KOH, W.P.; GIRGIS, L.; COOK, M.C.; BERTOLINO, P. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester and the virgin lymphocyte: A marriage made in heaven. **Immunol. and Cell Biol.** Adelaide, v.77, p.530-538, 1999.

FRANK, M.M.; FRIES, L.F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.322, n.9, p.322-26, 1991.

FUKUHARA, Y.D.M.; REIS, M.L.; DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; CUNHA F.Q.C.; DONADI, E.A. 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**, Oxford, v.41, n^o1, p. 49-55, 2003.

GWEE, M. C. E.; NIRTHANAN, S.; KHOO, H.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M.; CHEAH, L.S. Autonomic effects of some scorpion venoms and toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Victoria, v. 29, p. 795-801, 2002.

GWEE, M.C.E.; GOPALAKRISHNAKONE P.; CHEAH, L.S.; WONG, P.T.H.; GONG, J.P.; KINI, R.M. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, New York, v. 15, p. 37-57, 1996.

HERSH, E.M.; BODEY, G.P. Leukocytic mechanisms in inflammation. **Annu Rev Med.** Palo Alto, v. 21, p. 105-32, 1970.

ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**. Oxford, v. 33, p. 825-858, 1995.

ISHIKAWA, T. et al. Two new actions of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom: studies on the mechanism of actions on complement activation and on the central nervous system. **Toxicon**. Oxford, v.44, p.895-899, 2004.

JOVER, E.; MARTIN-MOUTOT, N.; COURAUD, F.; ROCHAT, H. Binding of scorpion toxins to rat brain synaptosomal fraction. Effects of membrane potential, ions, and other neurotoxins. **Biochemistry**. Washington, v.19, p.463-467, 1980a.

JOVER, E.; COURAUD, F.; ROCHAT, H. Two types of scorpion neurotoxin characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** New York, v.95, p.1607-1614, 1980b.

JUNE, C.H.; LEDBETTER, J.A.; LINSLEY, P.S.; THOMPSON, C.B. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. **Immunol. Today**. Amsterdam, v.11, p.211-216, 1990.

JUNIOR, J.C.M.; FLORÃO, A.; MATTANA, F.V.R.; ROCHA, F.H.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, A.M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação de atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, Curitiba, v.16, p.645-655, 2006.

KACZOROWSKI, G.J.; KOO, G.C. Lymphocyte ion channels as a target for immunosuppression. **Perspectives Drug Discovery Design**. Leiden, v.2, p.233-248, 1994.

KOO, G.C.; BLAKE, J.T.; TALENTO, A.; NGUYEN, M.; LIN, S.; SIROTINA, A.; SHAN, K.; MULVANY, K.; HORA, D.JR.; CUNNINGHAM, P.; WUNDERLER, D.L.; MCMANUS, O.B.; SLAUGHTER, R.; BUGIANESI, R.; FELIX, J.; GARCIA, M.; WILLIAMSON, J.; KACZOROWSKI, G.; SIGAL, N.H.; SPRINGER, M.S.; FEENEY, W. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses *in vivo*. **J. Immunol.** Baltimore, v. 158, p. 5120-5128, 1997.

LAMPSON, L.A.; LEVY, R. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. **J. Immunol.** v.125, p.293-299. 1980.

LICASTRO, F., DAVIS, L.J., MORINI, M.C. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T-lymphocytes affect immune response. **Int. J. Biochem.** Bristol, v. 25, p. 845-852, 1993.

MAGALHÃES, M.M.; PEREIRA, M.E.; AMARAL, C.F. *et al.* Serum levels of cytokines in patients envenomated by *Tityus serrulatus* scorpion sting. **Toxicon**. Oxford, v.37, p.1155-64.1999.

MARCUSSI, S; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; MAZZI, M.V.; **Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. Ribeirão Preto, 1º edição, 2011. FUNPEC-Editora

MELLO-LEITÃO, C. Escorpiões sul – americanos. **Arq. Mus. Nac.** Rio de Janeiro, v.40, p. 1-468, 1945.

MENDES, T.M.; DIAS F.; HORTA, C.C.R.; PENA, I. F.; ARANTES, E.C.; KALAPOTHAKIS, E. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 componet. **Toxicon**, Oxford, v.52, p.787-793, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv. Immunol.** New York, v.46, p.111-147. 1989.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSHI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** Baltimore, v. 175, n°1, p.5-14, 2005.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **J. Leukoc. Biol.** New York, v.73, p.209-212, 2003.

NETO, C.C.; FILHO, P.G.; IASSUDA, C.R.W. Ensaio de campo no controle de escorpiões (*T. serrulatus*) empregando Diazinon microencapsulado, na cidade de Aparecida, SP. Ver. **Soc. Brás. De Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 123, 1994.

OLIVEIRA, G.H.M.; C.N. BRANN; K. BECKER; V. THOHAN; M.M. KOERNER; M. LOEBE; G.P. NOON; G. TORRE-AMIONE Dynamic expression of the membrane attack complex (MAC) of the complement system in failing human myocardium. **Am. J. Cardiol.** New York, v.97, p.1626-1629, 2006.

PARISH, C.R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. **Immunol. Cell Biol.** Adelaide, v.77, p.499-508, 1999.

PEPYS, M.B. Role of complement in the induction of antibody production *in vivo*: effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. **J. Exp. Med.** Nova York, v.140, p.126-145, 1974.

PESSINI, A.C.; de SOUZA, A.M.; FACCIOLI, L.H.; GREGÓRIO, Z.M.; ARANTES, E.C. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. **Int. Immunopharmacol.** Amsterdam, v.3, p.765-774, 2003.

PESSINI, A.C.; SANTOS, D.R.; ARANTES, E.C.; SOUZA, G.E. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon.** Oxford, v.48, p.556-566, 2006.

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

PETRICEVICH, V.L. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. **Curr. Drug.Targets Inflamm. Allergy.** Cuernavaca, v.3, p.325-332. 2004.

PETRICEVICH, V.L. Balance between pro and anti-inflammatory cytokines in mice treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. **Mediators Inflamm.** Oxford, v. 2006, 11 pages, 2006.

PETRICEVICH, V.L. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. **Mediators Inflamm.** Oxford, v. 2010, 16 pages, 2010.

PETRICEVICH, V.L.; LEBRUN, I. Immunomodulation effect of the *Tityus serrulatus* venom on de murine macrophage funtions *in vitro*. **Mediators Inflamm.** Oxford, v.24, p.39-49, 2005.

PETRICEVICH, V.L.; HERNANDEZ C.A.; CORONAS F.I.V.; POSSANI, L.D. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. **Toxicon.** Oxford. v.50, p.666-75, 2007.

PETRICEVICH, V.L.; REYNAUD; CRUZ A.H.; POSSANI L.D. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillation by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. **Clin. Exp. Immunol.** Oxford, v.154, p.415-423, 2008.

PINSKY, M.R.; VINCENT, J.L.; DEVIERE, J.; ALEGRE, M.; KAHN, R.J.; DUPONT, E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-sytem organ failure and mortality. **Chest.** Chicago, v.103, p. 565-575, 1993.

POSSANI, L.D.; BECERRIL, B.; DELEPIERRE, M.; TYTGAT, J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **Eur. J. Biochem.** Berlin, v. 264, p. 287-300, 1999.

QUAH, B.J.C.; WARREN, H.S.; PARISH, C.R. Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Nature Protocols**. London, v.2, p.2049-2056, 2007.

QUAH, B.J.C.; PARISH, C.R. The use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. **J. Visual. Experim.** v.44, p.1-4, 2010.

REDDY, M.; EIRIKIS, E.; DAVIS, C.; DAVIS, H.M.; PRABHAKAR, U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an *in vitro* model to monitor cellular immune function. **J. Immunol. Methods**. Amsterdam, v.293, p.127-42, 2004.

RIDKER, P.M. Fibrinolytic and inflammatory markers for arterial occlusion: the evolving epidemiology of thrombosis and hemostasis. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v.78, p.53-59, 1997.

RODRIGUES DE LA VEGA, R.C.; MERINO, E.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Novel interaction between K⁺ channels and scorpion toxins. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v.24, p. 222-227, 2003.

SANDS, S.B.; LEWIS, R.S.; CAHALAN, M.D. Charybdotoxin blocks voltage-gated K⁺ channels in human and murine T lymphocytes. **J. Gen. Physiol.** Irvine, v.93, p.1061-1074. 1989.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, New York, v.6, p.345-352, 2005.

SISSOM, W.D. Systematic, biogeography, paleontology. In: Polis. G.A. (ed) **The biology of the scorpions**, California, Stanford University Press, p. 587, 1990.

TRUNEH, A.; ALBERT, F.; GOLSTEIN, P.; SCHMITT-VERHULST, A.M. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. **Nature**, London, v.313, p.318-320, 1985.

VAN DER MEIDE P.H.; SCHELLEKENS H. Cytokines and the immune response. **Biotherapy**. Dordrecht, v.8, p.243-249. 1996.

WATT, D.D.; SIMARD, J.M. Neurotoxic proteins in scorpion venom. **J. Toxicol.Toxin Rev.**, New York, v.3, p.181-221, 1984.

ZIEGLER, S.F.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M.R. The activation antigen CD69. **Stem cells**, Basel, v.12, p.456-465, 1994.

7. ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP n.º. 02/2010
kms

Ribeirão Preto, 8 de março de 2010.

Ilma. Sra.

PROF.^a. DR.^a. LUCIANA SIMON PEREIRA CROTT

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP- USP

Assunto: Aprovação de protocolo de pesquisa.

Prezado Professor,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 76ª Sessão Ordinária, realizada em 04/03/2010, o projeto de pesquisa intitulado "INVESTIGAÇÃO DE EFEITOS IMUNOMODULADORES DE VENENO BRUTO DE TITYUS SERRULATUS E SUAS FRAÇÕES SOBRE FUNÇÕES DE LINFÓCITOS HUMANOS", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP n.º. 166**.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª Dr.ª MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP - FCFRP/USP

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) (doador de sangue) em uma pesquisa intitulada “Investigação de efeitos imunomodulatórios de veneno bruto e suas frações sobre funções de linfócitos humanos” coordenado pela Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott e tendo como responsável pelos esclarecimentos sobre a pesquisa a farmacêutica Andrea Casella Martins, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Após os devidos esclarecimentos quanto a sua participação e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável.

O objetivo deste trabalho é investigar a influência de venenos de escorpiões em células que participam do sistema de defesa do organismo contra infecções (**linfócitos**), e desta forma, descobrir se o veneno em estudo produz modificações nestas células que podem alterar a sua função (marcadores de ativação; proliferação; secreção de citocinas) ou levá-las à morte (indução de citotoxicidade). Para doar o sangue, você não poderá estar utilizando medicamentos há pelo menos duas semanas.

O seguinte procedimento será realizado: será colhido 10 mL de sangue, uma única vez, após jejum de 8 horas. A colheita será realizada no período da manhã, por um profissional da área de saúde. Isto poderá trazer algum desconforto por causa da picada da agulha, sendo que é muito pequeno o risco de ocorrência de trauma. Os materiais utilizados serão descartáveis, não havendo risco de contaminação. Esperamos que este estudo resulte em contribuição importante para entender como esses venenos podem interferir em nosso sistema de defesa.

Se você estiver de acordo em participar, posso garantir-lhe que as informações fornecidas serão confidenciais e que o material coletado só será utilizado neste trabalho. Os resultados da pesquisa lhe serão fornecidos, se for de seu interesse. Não haverá despesas para você, pela sua participação. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, poderá entrar em contato com a Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott ou com a farmacêutica Andrea Casella Martins, pelo telefone (16) 36024241, ou no endereço Avenida do Café, s/n, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sem que isso represente qualquer prejuízo a você.

Eu, _____, acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) sobre a pesquisa “Investigação de efeitos imunomoduladores de veneno bruto de *Tityus serrulatus* e suas frações sobre funções de linfócitos T humanos” e concordo voluntariamente em participar da mesma, podendo retirar meu consentimento a qualquer momento, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

Ribeirão Preto _____/_____/_____

Assinatura: _____ RG: _____

Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott
(Orientadora)
CPF 050087178-71

Andrea Casella Martins
(Mestranda)
CPF 080663578-93

ANEXO C

1. Meio RPMI

RPMI	10,4g (um pacote)
NaHCO ³	2,0g
HEPES	2,38g
Antibiótico/antimicótico	10 mL
Glutamina 2mM.....	10 mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Quando este for completo, suplementar com 10% de soro bovino fetal (inativado a 56°C por 30 minutos).

Acertar pH a 7,2 – 7,4.

2. SDS 20% em HCl 0,01M

SDS.....	20g
HCl 0,01M.....	100ml
Preparar solução de HCl 0,01M	
HCl.....	31ml
H ₂ O.....	100ml

3. Tampão de FACS (PBS-SBF-azida)

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Soro Bovino Fetal.....	10mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL
Acertar pH a 7,4	

4. Solução CFSE 5mM

Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester	25mg
Dimethyl sulfoxide.....	8,96ml

5. Phosphate buffered saline (PBS) 10X

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

6. Solução de Lipopolysaccharide (LPS)

LPS	1mg
RPMI incompleto.....	1ml

Adicionar 500µl de RPMI, levar por 10 minutos ao vortex e 15 minutos ao banho de ultrassom, voltar ao vortex por mais 10 minutos, após este procedimento adicionar 500µl de RPMI incompleto e filtrar em membrana de 22µM.