

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
CAMPUS IV- CHAPADINHA-MA
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOYSSYMARA PONTES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTÓXICIDADE DOS VENENOS DE *Tityus bahiensis* e
Tityus serrulatus E SEUS EFEITOS SOBRE MACRÓFAGOS
INFECTADOS COM BACTÉRIAS**

Chapadinha - MA
2016

JOYSSYMARA PONTES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA CITOTÓXICIDADE DOS VENENOS DE *Tityus bahiensis* e
Tityus serrulatus E SEUS EFEITOS SOBRE MACRÓFAGOS
INFECTADOS COM BACTÉRIAS**

Monografia apresentada ao curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do
Maranhão para obtenção do grau de
Bacharel/Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Lucilene Amorim
Silva

Chapadinha - MA
2016

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

Pontes dos Santos, Joyssymara.

Avaliação da citotóxicidade dos venenos de *tityus bahiensis* e *tityus serrulatus* e seus efeitos sobre macrófagos infectados com bactérias / Joyssymara Pontes dos Santos. - 2016.

44 f.

Orientador(a): Lucilene Amorim Silva.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Atividade microbicida. 2. Citotocixidade. 3. *Tityus bahiensis*. 4. *Tityus serrultus*. I. Amorim Silva, Lucilene. II. Título.

À minha querida mãe, Maria Eliene, por me passar força, coragem e por sempre
acreditar em mim.

Ao meu amado pai, José Edivan, (*in memoriam*) que está ao lado de Jesus olhando
por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha saúde, por minhas conquistas e por sempre, sempre estar me abençoando.

A minha querida mãe, Maria Eliene, por tudo que fez e continua fazendo por mim ao longo desses 28 anos, tudo o que hoje sou, devo a ela.

A minha orientadora, professora Dra. Lucilene Amorim Silva, pela confiança em mim depositada e por todos os ensinamentos.

Ao meu amigo, padrasto, pai, Gabriel Rocha, pelo respeito, ensinamentos e por todos esses anos cuidando de minha mãe e de mim.

A minha irmã, Ana Karlla, por me guiar pelo seu caminho.

Ao meu colega de bancada, Luís Douglas, pelos momentos partilhados, por todos os ensinamentos repassados e disposição em sempre me ajudar na execução deste trabalho.

As amigadas construídas no LIF, Isolda Ribeiro, Jefferson Brito e todas as outras.

A minha amiga, Nayra Tacyanna, pela amizade, motivação, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu querido, Carvalho Jr., pelo companheirismo, paciência e apoio.

As biolindas, Raissa Costa, Jéssica Garreto, Vanderline Santos, Ivanilda Pereira, Flávia Zizeth, Núbia Costa, Elinalva Moraes, pela amizade e ensinamentos compartilhados e meu amigo Marcio André pelas palavras de apoio.

As minhas amigas, colegas de curso, Gabriela Marinho e Rayzza Rocha, pela amizade que construímos, que mesmo seguindo rumos diferentes, continuamos juntas.

Muito obrigada!

RESUMO

O escorpionismo é um problema que afeta vários países, em áreas de clima tropical e subtropical, principalmente nos centros urbanos. No Brasil, os escorpiões que geralmente são responsáveis pelos acidentes graves pertencem ao gênero *Tityus*, destaca-se *T. serrulatus*, com registros de óbitos e ampla distribuição no território nacional. De acordo com a literatura o vTs tem a capacidade de induzir a liberação de vários mediadores inflamatórios tais como IL-1 α , interferon- γ (INF- γ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral - α (TNF- α), IL-10 e prostaglandinas E₂. Estudos demonstram ainda que os peptídeos TsAP-1 e TsAP-2 isolados do veneno apresentam atividade microbicida. Com base nestas informações, o presente estudo visou avaliar a citotoxicidade do vTb e vTs em diferentes concentrações, em linhagem de células humanas e murinas, investigando também a ação do veneno puro na ativação de macrófagos, infectados com as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* presentes na flora normal de camundongos, além de uma bactéria gram-positiva resistente a meticilina, sendo esta *Staphylococcus aureus*. Sendo assim investigamos a toxicidade *in vitro* dos vTb e vTs nas concentrações de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, incubados por 24 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C, em macrófagos RAW 264.7 e células mononucleares do sangue periférico. As células foram cultivadas em placa de 96 poços a partir de uma suspensão celular de 2x10⁶/mL, a placa foi incubada por 1h em estufa de CO₂ a 5% a 37°C para posterior estimulação com 10 μL das suspensões dos vTb e vTs nas 1,0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$. Após o tempo de incubação, os macrófagos foram co-cultivados por 1h com 2x10⁷/mL de bactérias, obtendo-se uma multiplicidade de infecção de 1:10. Em seguida, os macrófagos foram lisados para liberação das bactérias fagocitadas e por meio do ensaio de MTT verificou-se a viabilidade celular das bactérias para obtenção da porcentagem de atividade microbicida. Além disso, foi realizada a dosagem de óxido nítrico do sobrenadante de culturas de macrófagos estimuladas por 2 hs com Lipopolissacarídeo e incubados em seguida com veneno em estufa por 48 hs. Os resultados mostraram que não houve efeito citotóxico do vTb para linhagens murina, porém, quando analisado o vTs nessas linhagens percebeu-se efeito citotóxico. Os vTb e vTs não demonstraram atividades citotóxicas para linhagem humana. Os ensaios com *E. coli*, evidenciaram que a cepa tratada com diferentes concentrações dos venenos, obtiveram aumento significativo na atividade citotóxica em relação aos grupos sem estímulo (Ctrl) e estimulado com LPS. Em relação a bactéria *E. faecalis*, o vTb obteve menor atividade citotóxica em comparação ao controle, no entanto o vTs demonstrou o contrário quando comparado ao controle. O efeito citotóxico em *S. aureus* resistente a meticilina apresentou-se significativo na concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de vTb em comparação ao controle. Em relação a produção de óxido nítrico, foi observado relevante aumento no grupo estimulado com 0,1 $\mu\text{g/mL}$ do vTb e 10 $\mu\text{g/mL}$ do vTs. Dessa forma podemos concluir que tanto o vTb bem como o vTs foi capaz de potencializar a atividade microbicida de macrófagos, bem como estimular a produção de óxido nítrico na maior concentração testada. Além disso, resultados mostraram que os vTb e vTs, são capazes de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , com destaque nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de vTb.

Palavras-chave: *Tityus bahiensis*, *Tityus serrulatus*, Citotoxicidade, Atividade microbicida.

ABSTRACT

The scorpion is a problem that affects several countries, in areas of tropical and subtropical climate, especially in urban centers. In Brazil, the scorpions that are usually responsible for the serious accidents belong to the genus *Tityus*, stands out *T. serrulatus*, with records of deaths and wide distribution in the national territory. According to the literature, vTs has the ability to induce the release of various inflammatory mediators such as IL-1 α , interferon- γ (INF- γ), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), necrosis factor Tumor- α (TNF- α), IL-10 and prostaglandins E2. Studies also show that the peptides TsAP-1 and TsAP-2 isolated from the venom present microbicidal activity. Based on this information, the present study aimed to evaluate the cytotoxicity of vTb and vTs at different concentrations in human and murine cell line, investigating also the action of pure venom in the activation of macrophages, infected with the bacteria *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* present in the normal mouse flora, in addition to a gram-positive bacterium resistant to methicillin, being this *Staphylococcus aureus*. Therefore, we investigated the in vitro toxicity of vTb and vTs at concentrations of 1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, incubated for 24 hours in 5% CO₂ incubator at 37 ° C in RAW 264.7 macrophages and peripheral blood mononuclear cells. The cells were cultured in a 96-well plate from a 2x10⁶ / ml cell suspension, the plate was incubated for 1 h in a 5% CO₂ incubator at 37 ° C for further stimulation with 10 μL of the vTb and vTs suspensions in the 1.0 Mg / ml, 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$. After the incubation time, the macrophages were cocultured for 1 h with 2x10⁷ / ml of bacteria, obtaining a multiplicity of infection of 1:10. Then the macrophages were lysed for release of the phagocytized bacteria and by the MTT assay the cell viability of the bacteria was verified to obtain the percentage of microbicidal activity. In addition, nitric oxide was measured from the supernatant of macrophage cultures stimulated for 2 h with Lipopolysaccharide and incubated with venom in an oven for 48 h. The results showed that there was no cytotoxic effect of vTb on murine lines, however, when analyzed the vTs in these lines was observed a cytotoxic effect. The vTb and vTs did not demonstrate cytotoxic activities for human lineage. The *E. coli* assays showed that the strain treated with different concentrations of the poisons obtained a significant increase in cytotoxic activity in relation to the non-stimulated (Ctrl) and LPS-stimulated groups. In relation to the *E. faecalis* bacterium, vTb obtained lower cytotoxic activity in comparison to the control, however the vTs showed the opposite when compared to the control. The cytotoxic effect on methicillin resistant *S. aureus* was significant at 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ vTb concentration compared to the control. Regarding the production of nitric oxide, a significant increase was observed in the group stimulated with 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of vTb and 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of vTs. In this way we can conclude that both vTb as well as vTs were able to potentiate the microbicidal activity of macrophages, as well as to stimulate the production of nitric oxide in the highest concentration tested. In addition, results showed that vTb and vTs are capable of enhancing the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , prominent at concentrations of 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ vTb.

Key words: *Tityus bahiensis*, *Tityus serrulatus*, Cytotoxicity, Microbicidal activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Escorpião da espécie <i>Tityus bahiensis</i>	16
Figura 2- Escorpião da espécie <i>Tityus serrulatus</i>	17
Figura 3- Demonstração esquemática do mecanismo de ação do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> sobre macrófagos.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentual de citotoxicidade celular <i>in vitro</i> dos venenos de <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i> em macrófagos Raw 264.7	27
Gráfico 2 - Percentual de citotoxicidade celular <i>in vitro</i> dos venenos de <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i> em PBMC	28
Gráfico 3 - Atividade microbicida de macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Escherichia coli</i>	28
Gráfico 4 - Atividade microbicida de macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Enterococcus faecalis</i>	29
Gráfico 5 - Atividade microbicida de macrófagos RAW 264.7 infectados com <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina MRSA	30
Gráfico 6 - Efeito do veneno na produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7	31
Gráfico 7 - Efeito dos venenos de <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i> nos níveis de IL-6 e TNF- α	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BEAS	Células epiteliais brônquicas humanas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeo
METS	Armadilhas Extracelular de Macrófagos/monócitos
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2-5 difeniltetrazólio
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução Salina tamponada com fosfato
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PHA	Fiohemaglutamina
MØ RAW 264.7	Macrófagos murinos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VTs	Veneno de <i>T.bahiensis</i>

VTb	Veneno de <i>T. serrulatus</i>
TsAP-1	Fração de uma peçonha de <i>T. serrulatus</i>
TsAP-2	Fração de uma peçonha de <i>T. serrulatus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i>	16
2.2 Ações do veneno sobre células do sistema imune	18
2.3 Resposta imune a infecções bacterianas	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVOS GERAIS	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1. Veneno de <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i>	22
4.2. Obtenção dos Macrófagos Raw 264.7	22
4.3. Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	23
4.4. Bactérias.....	23
4.5. Opsonização das bactérias.....	23
4.6. Dosagem de Óxido Nítrico	24
4.7. Quantificação de citocinas (ELISA)	24
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
5.1. Determinação da citotoxicidade do veneno pelo método de MTT	25
5.2. Atividade microbica	25
5.3. Análise Estatística	26
6. RESULTADOS	27
6.1. Citotoxicidade dos venenos de <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i> em macrófagos da linhagem RAW 264.7.....	27
6.2. Citotoxicidade dos venenos de <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i> em células Mononucleares do sangue periférico (PBMC).	27
6.3. Atividade microbica de macrófagos infectados com <i>Escherichia coli</i>	28
6.4. Atividade microbica de macrófagos infectados com <i>Enterococcus faecalis</i>	29
6.5. Atividade microbica de macrófagos infectados com <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA).	29
6.6. Efeito dos venenos de <i>Tityus bahiensis</i> e <i>Tityus serrulatus</i> na produção de óxido nítrico.	30
6.7. Dosagem das citocinas IL-6 e TNF- α pelo método de ELISA	31

7. DISCUSSÃO	33
8. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

O escorpionismo é um problema que afeta vários países, em áreas de clima tropical e subtropical, principalmente nos centros urbanos. (BRASIL, 2014; LOURENÇO, 2015). Os acidentes abrangem um conjunto de sintomas que estão especificamente relacionados a espécie causadora e a quantidade de veneno inoculado, levando em consideração as condições físicas e fisiológicas das vítimas (CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2009; PETRICEVICH, 2010).

No Brasil, os escorpiões que geralmente são responsáveis pelos acidentes graves pertencem ao gênero *Tityus*. Entre os principais causadores de acidentes graves desse gênero, destaca-se *Tityus serrulatus*, com registros de óbitos e ampla distribuição no território nacional, além de ser indicado como maior número de registros de acidentes com escorpiões, principalmente com crianças menores de 10 anos (MARCUSSEI *et al.*, 2011; BRASIL, 2014).

De acordo com a literatura o veneno de *Tityus serrulatus* tem a capacidade de induzir a liberação de vários mediadores inflamatórios tais como interleucina 1- α (IL-1 α), interferon- γ (INF- γ), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (MAGALHÃES *et al.*, 1999), fator de necrose tumoral - α (TNF- α) (ZOCCAL *et al.*, 2013), interleucina 10 (IL-10) (PETRICEVICH *et al.*, 2010) e prostaglandinas (E₂) (NASCIMENTO *et al.*, 2005; ZOCCAL *et al.*, 2013)

O veneno de *Tityus serrulatus* induz também o recrutamento de células do sistema imune para os órgãos linfóides, peritônio e sangue, além disso, aumenta as concentrações de citocinas expressando a capacidade do veneno de induzir uma resposta inflamatória aguda imediata (FIALHO *et al.*, 2011). Alguns estudos demonstram ainda que os peptídeos TsAP-1 e TsAP-2 isolados do veneno apresentam atividade microbicida contra algumas bactérias gram positivas e negativas (GUO *et al.*, 2013; ALMAAYTHA & ALBALAS, 2013).

Em virtude do aparato literário que relata o potencial de ativação e indução de mediadores inflamatórios em células quando expostas ao veneno de *Tityus serrulatus*, o presente trabalho investigou a ação do mesmo, sobre macrófagos infectados *in vitro*

com bactérias da flora normal de camundongos, e uma bactéria gram-positiva resistente a meticilina, além de avaliar a citotoxicidade dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* sobre leucócitos humano e murinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*

O gênero *Tityus* pertence à família Buthidae, sendo representado por mais 50 espécies (LOURENÇO, 2015). Os escorpiões desse gênero são extensamente estudados devido à ameaça que oferece ao ser humano e também pela importância médica que algumas espécies desse gênero apresentam, neste caso as espécies, *Tityus serrulatus* Lutz e Mello, 1922; *Tityus bahiensis* Perty, 1833; *Tityus stingmurus* Thorell, 1876 e *Tityus paraensis* Kraepelin, 1896 (BRASIL, 2014; PUCCA et al., 2015).

A espécie *Tityus bahiensis* mede cerca de 5 a 7 cm de comprimento, é também conhecida como escorpião marrom, seu tronco e cauda apresenta coloração marrom/avermelhada. Responsável pelos acidentes no estado de São Paulo, a espécie de *Tityus bahiensis* é encontrada nos estados da Bahia, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina (MARCUSSEI et al., 2011; BRASIL, 2014) (Figura 1).



Figura 1: Escorpião da espécie *Tityus bahiensis* (Manual de controle de escorpião/Ministério da Saúde; 2009. Fotos: Denise Maria Cândido)

A espécie *Tityus serrulatus* chega a atingir 7 cm de comprimento, tronco escuro e pernas e cauda amarela (Figura 2). Apresenta uma razoável capacidade de

distribuição por ocupar a maioria dos ambientes terrestres e possuir grande capacidade de se adaptar em ambientes antrópicos. Encontram-se distribuídos nos estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Paraná (MARCUSSEI *et al.*, 2011; BRASIL, 2014).



Figura 2: Escorpião da espécie *Tityus serrulatus* (Manual de controle de escorpião/Ministério da Saúde; 2009. Fotos: Denise Maria Candido)

O veneno de *Tityus serrulatus* possui um elevado nível tóxico quando comparado aos venenos de outras espécies brasileiras, considerado assim o principal agressor de todos os casos graves de escorpionismo (SOUZA *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2010; BRASIL, 2014).

O efeito do veneno abrange uma série de manifestações clínicas que vão desde casos mais simples até quadros mais complexos ou mesmo causar o óbito devido a algumas reações geradas pelas ações do veneno se não houver o devido tratamento (CUPO *et al.*, 1994). Além da dor, as manifestações clínicas são caracterizadas de acordo com seu grau de severidade, estas são classificadas como, leves (acidentes leves, ocorrem vômitos, taquicardia e agitação), moderados (acidentes moderados ocorrem manifestações sistêmicas como transpiração, náuseas, taquipnéia e hipertensão) e graves (acidentes graves ocorrem manifestações sistêmicas intensas como hipertensão arterial, taquipnéia e hiperpnéia, taquicardia e bradicardia, sudorese profunda, vômitos profusos,

salivação excessiva, alternância entre agitação e exaustão, convulsões podendo evoluir para choque cardíaco e edema agudo de pulmão, causas mais frequentes de óbito) (CUPO *et al.*, 1994, BRASIL, 2014).

2.2 Ações do veneno sobre células do sistema imune

Composto por um conjunto de toxinas, o veneno de escorpião apresenta inúmeras propriedades biológicas (PETRICEVICK, 2005). A composição da peçonha pode variar de acordo com os hábitos alimentares, região geográfica e variações genéticas (MARCUSSEI *et al.*, 2011). Estudos tem demonstrado que em resposta ao veneno, macrófagos entram em um processo de ativação e imunomodulação, e secretam mediadores como óxido nítrico (NO) e citocinas (PETRICEVICK, 2004).

Estudos realizados *in vivo* demonstraram a capacidade imunomoduladora do veneno de *Tityus serrulatus*, evidenciando que camundongos com sepse e tratados com veneno modulam a resposta inflamatória via mecanismos de auto-regulação, mediado por IL-10, capaz de diminuir a inflamação exacerbada, evitando a morte dos animais (MACIEL *et al.*, 2014).

As citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8, liberadas pelas células epiteliais brônquicas humanas (BEAS) contribuem para o recrutamento leucocitário induzido pelo veneno e/ou aumento de permeabilidade vascular, eventos causados pelo veneno de *Tityus serrulatus* já demonstrados na literatura (ZULIANI *et al.*, 2013)

Os macrófagos possuem um importante papel na resposta imune e na apresentação de antígenos no processo de defesa, deste modo, quando um macrófago entra em contato com um antígeno ocorre um estímulo tornando-os ativos (PETRICEVICH; REYNAUD; CRUZ; POSSANI; 2008).

Petricevick (2005) comprovou que o veneno de *Tityus serrulatus* tem a capacidade de exercer funções sobre os macrófagos, através do tratamento com frações de veneno, observando também a produção de citocinas pró-inflamatórias de fase aguda.

Zoccal *et al.*, (2011) em ensaios *in vitro* observaram que o veneno bruto e algumas frações (Ts1, Ts2 e Ts6) tem a capacidade de ativar macrófagos murinos, estimulando a produção de óxido nítrico (NO), IL-6 e TNF- α . Fialho *et al.*, (2011)

constataram que a administração via intraperitoneal de uma dose não-letal do veneno de *Tityus serrulatus* em camundongos, promove o recrutamento celular dos órgãos linfóides e migração para a cavidade peritoneal, principalmente de macrófagos, além de estabelecer um equilíbrio na resposta inflamatória com liberação de citocinas inflamatórias e regulatórias.

Portanto, venenos escorpiônicos, em especial de *Tityus serrulatus*, parecem constituir possíveis ferramentas biotecnológicas, pois a modulação de suas diferentes atividades fisiológicas e farmacológicas pode ser utilizada no desenvolvimento futuro de fármacos e alternativas terapêuticas (PETRICEVICH, 2010).

2.3 Resposta imune a infecções bacterianas

As bactérias são organismos procariontes microscópicos encontrados em diversos nichos ecológicos e são de grande importância médica e científica. Espécies como *Escherichia coli* podem causar diversas doenças humanas, desde intensas diarreias a infecções que se estendem a partir do trato gastrointestinal para sítios extra-intestinais, tais como trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central, já as infecções por *Staphylococcus aureus* ocorrem frequentemente em consequência da colonização de feridas abertas, onde pode causar severos danos nas superfícies das mucosas e pele. (KAPER *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2009).

Segundo a WHO (2014), para o tratamento das infecções causadas por bactérias utilizam-se a mais de 70 anos os antibióticos, onde o primeiro fármaco com atividade bactericida foi a penicilina, descoberta pelo pesquisador Alexander Fleming em 1928. E desde a introdução em 1937 dos primeiros agentes antimicrobianos eficazes, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência específicos as suas utilizações terapêuticas, onde os primeiros casos foram relatados no final dos anos de 1930 (DAVIES & DAVIES, 2010).

O uso inadequado de antibióticos resultou no surgimento cepas resistentes a esses medicamentos (TOPRAK *et al.*, 2011). A resistência é provocada por processos naturais, condicionados por fatores intrínsecos ou adquirido por transmissão ou pela troca de material genético (ZHANG *et al.*, 2010).

Com o crescente aumento dos casos de resistência bacteriana nos últimos anos, cada vez mais as pesquisas avançam com o objetivo de descobrir novas drogas com

potencial bactericida, sendo elas formadas por peptídeos naturais de defesa do hospedeiro ou por peptídeos de produtos naturais (AFACAN *et al.*, 2012, WONG *et al.*, 2012).

O papel dos macrófagos é de grande importância na resposta a infecções por patógenos como as bactérias, uma vez que, são células dinâmicas e distribuídas em diversos tecidos. E estas células são conhecidas pela habilidade de eliminar micróbios invasores através da fagocitose, além de utilizar mecanismos oxidativos ou não oxidativos contra patógenos, seja pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou liberação de armadilhas de DNA extracelular (Mets), respectivamente (WEISS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2014).

Alguns estudos já demonstram a importância do uso de produtos naturais, em especial o efeito de venenos oriundos de animais, com potencial bactericida (SAMMY *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2015), dentre estes podemos destacar o veneno do escorpião *Tityus serrulatus*, onde estudos relatam que os peptídeos isolados TsAP-1 e TsAP-2 apresentam atividade microbiana contra algumas bactérias gram-positivas e negativas (GUO *et al.*, 2013; ALMAAYTHA & ALBALAS, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a ação dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* sobre a ativação de macrófagos em infecções *in vitro* com bactérias e sua atividade citotóxica sobre linhagens humanas e murinas.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos venenos das espécies *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* em monócitos humanos;
- Avaliar a citotoxicidade dos venenos das espécies *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* em macrófagos murinos;
- Quantificar a produção de citocinas por macrófagos pós-estímulo com venenos das espécies *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*
- Realizar a infecção *in vitro* de macrófagos com microrganismos da flora normal dos camundongos e com cepa resistente a metilina;
- Investigar a ativação dos macrófagos tratados com veneno das espécies de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* pós infecção com bactérias

4. METODOLOGIA

4.1. Veneno de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*.

O veneno bruto liofilizado do escorpião *Tityus bahiensis* (vTb) e *Tityus serrulatus* (vTs) foram obtidos do Laboratório de Artrópodes do Instituto Butantan. Os venenos foram mantidos à -20°C no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão até o momento do uso, quando foi então diluído em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino 10%.

4.2. Obtenção dos Macrófagos Raw 264.7

Os macrófagos murinos RAW 264.7 foram obtidos do Laboratório de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, em garrafas para cultura estéreis contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SBF) 10% e acondicionadas em câmara de CO₂ 5% a 37°C.

A cultura de macrófagos RAW 264.7 foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Silva (2007). Foi utilizado o *cell scraper* para o despreendimento dos macrófagos da garrafa de cultura utilizando-se 2 mL de meio DMEM. Para contagem do número de células foram retirados 90µL desta suspensão e coradas com 10µL de azul de tripan numa proporção de 9:1. As células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz com aumento de 400 vezes.

As células foram centrifugadas à 1200rpm/10minutos/12°C. Logo após, o sobrenadante foi descartado e as mesmas ressuspensas em meio DMEM fresco, afim de obter uma suspensão de 2x10⁶ células/mL.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100µL/poço da suspensão celular e posteriormente incubada em câmara de CO₂ 5% a 37°C por 1 hora para aderência dos macrófagos. Após esse tempo o sobrenadante da cultura foi retirado e adicionado meio DMEM, em seguida as células foram estimuladas com 10µL de uma suspensão do

veneno puro nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL e 10µg/mL. A cultura foi incubada por 24 horas em câmara de CO₂.

4.3. Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Células mononucleares do sangue periférico foram separadas após centrifugação a 1500rpm/40minutos em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077) (Sigma Diagnostics, Inc., Missouri, EUA). As células foram isoladas pelo método descrito por Böyum (1968). As mesmas foram centrifugadas a 1200rpm/10minutos com soro fisiológico por 3 vezes, em seguida as células foram ressuspensas com 1 mL de RPMI com SBF 10% para realização da contagem em câmara de Neubauer com o corante azul de tripan. As células foram ajustadas para uma concentração de 2×10^6 /mL e em uma placa de 96 poços e foram adicionados 100µL/poço da suspensão celular. Posteriormente incubadas em câmara de CO₂ 5% a 37°C por 24 horas para aderência dos monócitos.

4.4. Bactérias

Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) obtidas do Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão. As bactérias foram cultivadas em caldo Brain Heart Fusion (BHI) e mantidas em estufa bacteriológica à 37°C por 18 horas.

Após a incubação, a suspensão de bactérias foi centrifugada à 1500rpm/10minutos/25°C, onde o *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de PBS estéril para o ajuste da concentração de microrganismos em 2×10^7 /mL por espectrofotometria (escala de McFarland-bactérias). O ensaio foi realizado conforme o método descrito por Boura (2012).

4.5. Opsonização das bactérias

O modelo experimental foi realizado de acordo com as regras de experimentação animal aprovação na Comissão de Ética de Uso Animal-CEUA da

Universidade Federal do Maranhão (23115.005089/2015-01). Para obtenção do material opsonizante, foram eutanasiados camundongos Swiss (n=6) para coleta do sangue que posteriormente passou por centrifugação (3000rpm/10minutos) para separação do soro. Em seguida, as opsoninas foram adicionadas a suspensão de bactérias numa proporção de 10% do volume.

A suspensão foi incubada por 30 minutos em estufa bacteriológica a 37°C e posteriormente utilizada no ensaio. O ensaio foi realizado conforme o método descrito por Boura (2012).

4.6. Dosagem de Óxido Nítrico

Para a dosagem de óxido nítrico foi utilizado o método descrito por DING (1988). A cultura de macrófagos RAW 264.7 foi feita em placa de 96 poços e foram estimuladas previamente por 2 horas com Lipopolissacarídeo de *E. coli*, em seguida 10µL das concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL e 10µg/mL do veneno de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* foram adicionadas as culturas e a placa foi incubada em estufa de CO₂ por 48 horas. Após esse tempo, 50µL do sobrenadante foi retirado para realizar a dosagem de NO, através da adição de 50µL do Reagente de Griess. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

4.7. Quantificação de citocinas (ELISA)

Após as 24 horas de incubação foi coletado o sobrenadante da cultura de células para dosagem de citocinas pelo método de ELISA usando-se o kit mouse TNF-α e mouse interleukin-6 (IL-6) obtidos pela e Bioscience, os ensaios foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1. *Determinação da citotoxicidade do veneno pelo método de MTT*

A avaliação citotóxica dos venenos *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* foi realizado o método de citotoxicidade descrito por Mosmann (1983). Os Macrófagos RAW e os monócitos humanos foram ajustados para 2×10^5 de células por poço (em placa de cultura de 96 poços) e mantidos em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 5%, por 1 e 24 horas em estufa de CO₂, respectivamente. Após esse período de aderência as células foram estimuladas com 10µL de uma suspensão do veneno puro de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* nas concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL e 10µg/mL. As culturas foram incubadas por 24 horas em câmara de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi retirado (para armazenamento a -20°C) e reposto 100µL de meio RPMI para o teste de citotoxicidade, acrescentando-se 10µL do MTT (- (4, 5-dimetiltiazolil-2) -2, Brometo de 5-difeniltetrazólio) nos poços para incubação por 3 horas. Após esse período, 100µL de SDS foi adicionado e as culturas de células incubadas por overnight. As leituras das placas foram realizadas em espectrofotômetro com filtro 570 nm para determinar a absorbância.

5.2. *Atividade microbicida*

A atividade microbiana foi realizada de acordo método descrito por Boura (2012). Após as 24 horas em contato com os venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* o sobrenadante foi retirado da cultura de macrófagos e os poços foram lavados uma vez com PBS estéril, em seguida adicionou-se 100µL/poço da suspensão de bactérias opsonizadas, dessa forma obtendo-se uma multiplicidade de infecção de 1 Raw para 10 bactérias (MOI 1:10). A cultura foi incubada por 1 hora em câmara de CO₂. Após a incubação o sobrenadante foi descartado e os poços lavados uma vez com PBS estéril, posteriormente adicionou-se 100µL de Triton-X 100 a 1% por 10 minutos a temperatura ambiente para lise da células e liberação das bactérias fagocitadas.

Em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril e a placa centrifugada à 1700rpm/10minutos/25°C. O sobrenadante foi descartado para adição da solução de PBS com 2% de glicose e 1% de soro fetal bovino e adicionar 10µL de

5mg/mL MTT [4,5-dimetilazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium brometo em cada poço da placa, onde foi incubada por 2 horas em câmara de CO₂. Após a incubação a placa foi centrifugada à 1700rpm/10minutos/25°C, enquanto o sobrenadante foi descartado para adicionar 100µL de dimetilsufóxido (DMSO) por 30 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. Em espectrofotômetro foi realizada a leitura da placa a 620nm (Boura, 2012).

5.3. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPadPrism 5.0 (GraphPad Software Inc.), utilizando o teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Em todos os casos os resultados foram considerados significantes quando, $p \leq 0,05$. Os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão dos grupos tratados em relação ao controle, conforme o caso.

6. RESULTADOS

6.1. Citotoxicidade dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* em macrófagos da linhagem RAW 264.7.

Os venenos de *Tityus bahiensis* não apresentou efeito citotóxico para linhagens de células murinas (macrófagos Raw 264.7.), mesmo nas concentrações mais elevadas (Gráfico 1A). No gráfico 1B é percebido atividade citotóxica em todas as concentrações testadas em relação ao veneno de *Tityus serrulatus*.

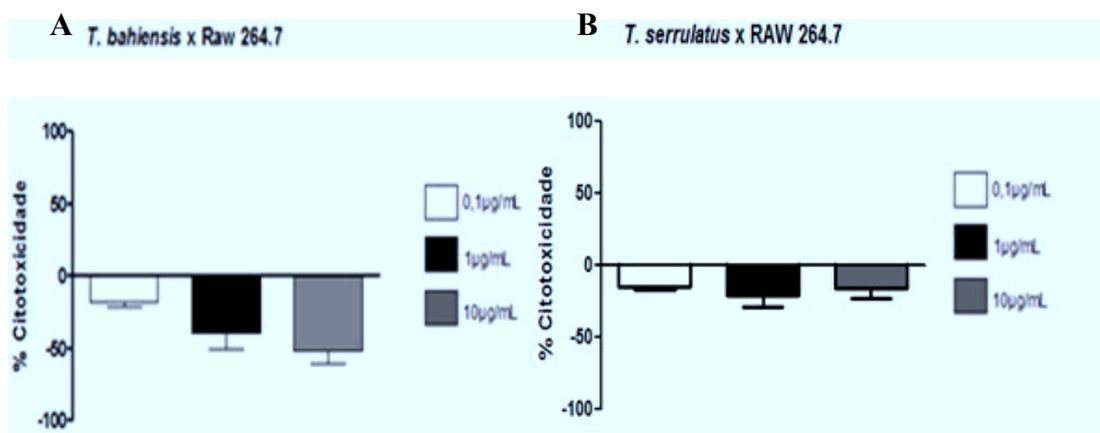


Gráfico 1. Percentual de Citotoxicidade celular *in vitro* dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* sobre macrófagos Raw 264.7. As células foram estimuladas com 10 µL de uma suspensão do veneno puro de *Tityus bahiensis* (Gráfico 1A) e *Tityus serrulatus* (Gráfico 1B) por 24 horas e a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT nas concentrações de 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL.

6.2. Citotoxicidade dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* em células Mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Os resultados da avaliação citotóxica dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* obtidos a partir do ensaio com MTT demonstraram que os mesmos não apresentaram efeito citotóxico para monócitos, mesmo nas concentrações mais elevadas. (Gráfico 2).

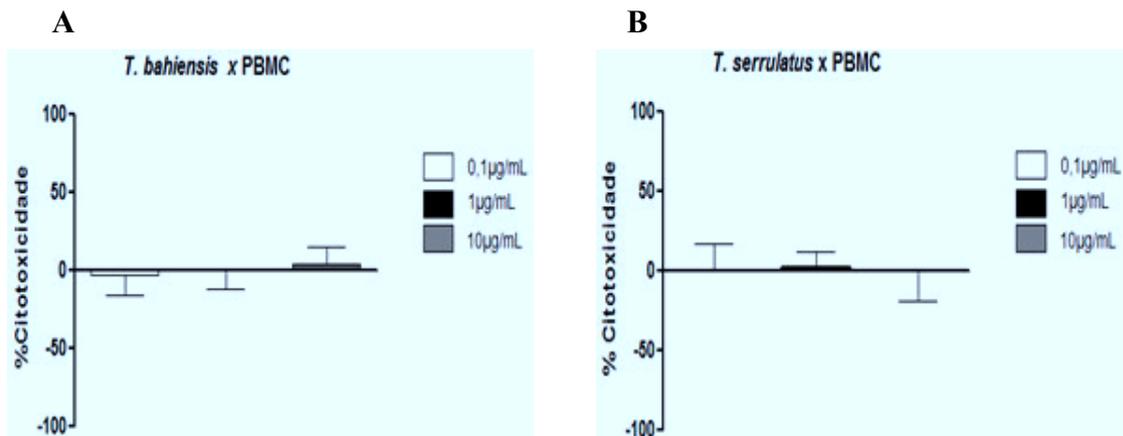


Gráfico 2. Percentual de citotoxicidade celular *in vitro* dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* sobre PBMC. As células foram estimuladas com 10 µL de uma suspensão do veneno puro de *Tityus bahiensis* (Gráfico 2A) e *Tityus serrulatus* (Gráfico 2B) por 24 horas e a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT nas concentrações de 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL.

6.3. Atividade microbicida de macrófagos infectados com *Escherichia coli*

Os resultados da ação microbicida dos macrófagos RAW 264.7 tratados com os venenos bruto de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* e em seguida infectados com *Escherichia coli* foram obtidos a partir da análise de citotoxicidade. De acordo com nossos achados, somente os grupos tratados com diferentes concentrações dos venenos de *Tityus serrulatus* apresentaram aumento significativo de atividade citotóxica quando comparados ao controle (Ctrl) e aos estimulados com LPS.

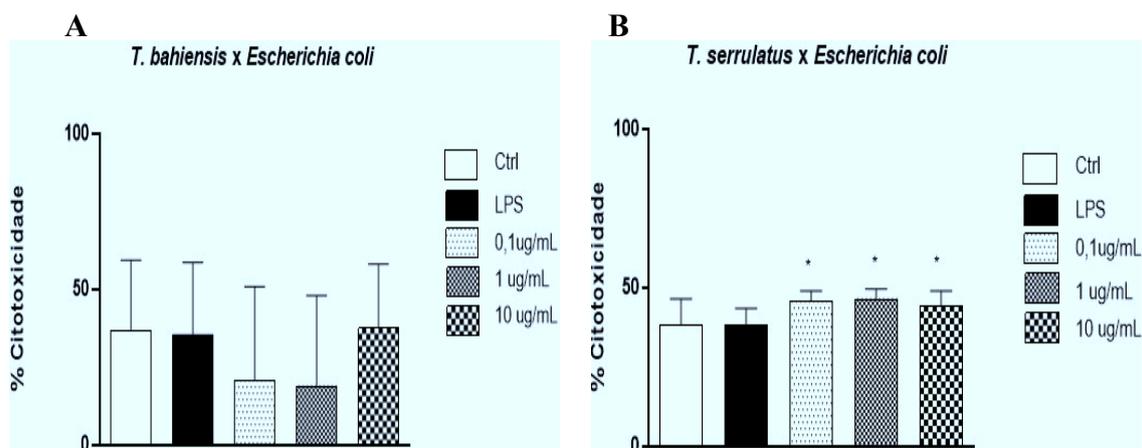


Gráfico 3. Atividade microbicida de macrófagos RAW 264.7 infectados com *Escherichia coli*. Os macrófagos foram estimulados com as concentrações 0,1 µg/mL, 1 µg/mL e 10 µg/mL do veneno bruto de *Tityus bahiensis* (Gráfico 3A) e *Tityus serrulatus* (Gráfico 3B) por 24 horas e em seguida infectadas com *Escherichia coli* por 1 hora (MOI 1:10). Os resultados expressam a média ± desvio padrão e $P < 0,05$

quando comparado ao *Ctrl (sem estímulo) ou ao grupo estimulado com #LPS. Controle* Lipopolissacarídeo#.

6.4. Atividade microbica de macrófagos infectados com *Enterococcus faecalis*

Os resultados da ação microbica dos macrófagos tratados com os venenos bruto de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* e em seguida infectados com *Enterococcus faecalis* foram obtidos a partir da análise de citotoxicidade. Em relação aos nossos achados, os grupos tratados com diferentes concentrações do veneno de *Tityus bahiensis* representado pelo gráfico 4A, mostrou que não houve atividade citotóxica quando comparado ao controle e o LPS. Contudo, o tratamento com o veneno de *Tityus serrulatus* representado pelo gráfico 4B evidenciou aumento significativo de citotoxicidade bacteriana em comparação as células que não receberam estímulo (Ctrl).

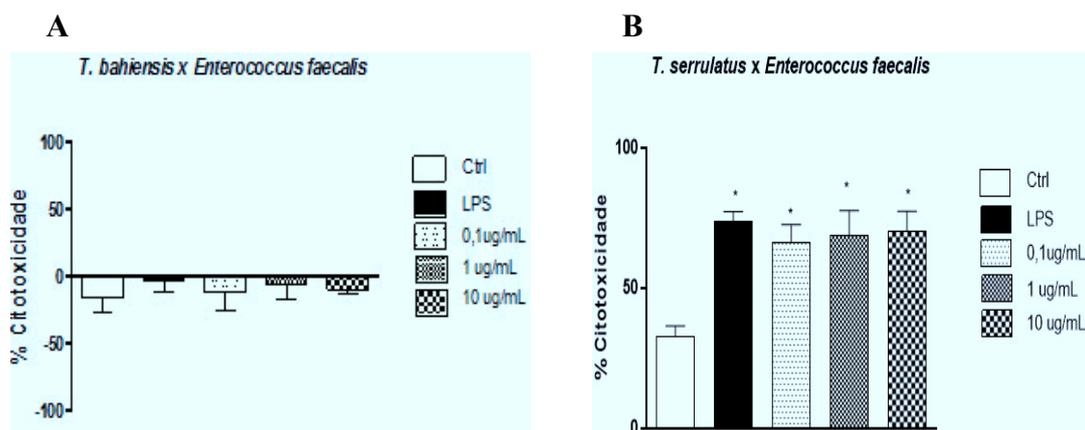


Gráfico 4. Atividade microbica de macrófagos RAW 264.7 infectados com *Enterococcus faecalis*. Os macrófagos foram estimulados com as concentrações 0,1, 1 e 10 µg/mL dos venenos bruto de *Tityus bahiensis* (Gráfico 4A) *Tityus serrulatus* (Gráfico 4B) por 24 horas e em seguida infectados por *Enterococcus faecalis* por 1 hora (MOI 1:10). Os resultados expressam a média ± desvio padrão e $P < 0,05$ quando comparado ao *Ctrl (sem estímulo) ou ao grupo estimulado com #LPS. Controle* Lipopolissacarídeo#.

6.5. Atividade microbica de macrófagos infectados com *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

Os resultados da ação microbica dos macrófagos tratados com os venenos bruto de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* e em seguida infectados com *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina foram obtidos a partir da análise de citotoxicidade. Segundo os nossos resultados, os grupos tratados com diferentes

concentrações do veneno de *Tityus bahiensis* representado pelo gráfico 5A, mostrou que não houve efeito citotóxico significativo, demonstrando diferença apenas em relação ao grupo sem estímulo do LPS. No grupo tratado com 10µg/mL do veneno de *Tityus serrulatus* foi observado aumento na citotoxicidade, com diferença em relação ao grupo sem estímulo (Ctrl).

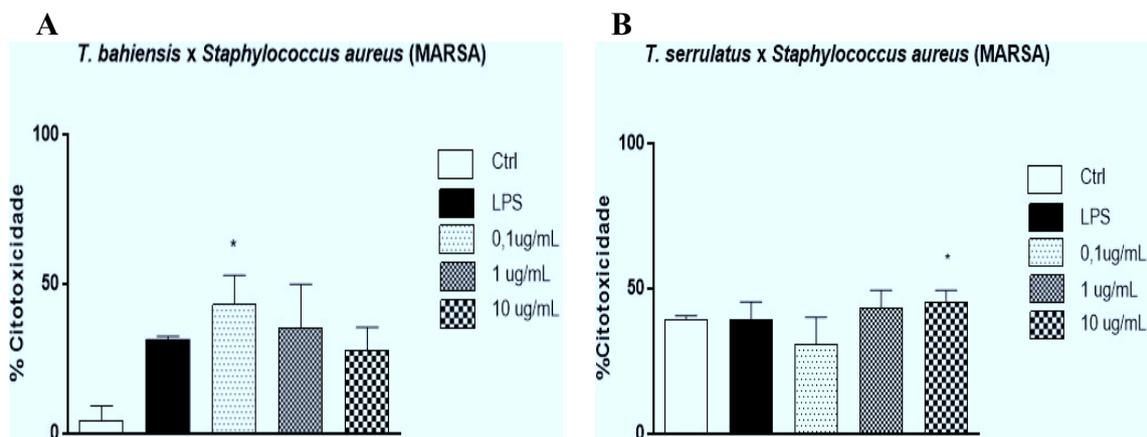


Gráfico 5. Atividade microbicida de macrófagos RAW 264.7 infectados com *Staphylococcus aureus* (MRSA). Os macrófagos foram estimulados com as concentrações 0,1, 1 e 10µg/mL dos venenos bruto de *Tityus bahiensis* (Gráfico 5A) e *Tityus serrulatus* (Gráfico 5B) por 24 horas e em seguida infectadas com *Staphylococcus aureus* (MRSA) por 1 hora (MOI 1:10). Os resultados expressam a média ± desvio padrão e $P < 0,05$ quando comparado ao *Ctrl (sem estímulo) ou ao grupo estimulado com #LPS. Controle* Lipopolissacarídeo#.

6.6. Efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* na produção de óxido nítrico.

A quantificação de NO foi realizada no sobrenadante da cultura de macrófagos estimuladas com LPS por 2 horas e em seguida com as concentrações de 0,1µg/mL, 1µg/mL e 10µg/mL dos venenos bruto de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* por 24 horas. O veneno de *Tityus bahiensis* demonstrou, que o grupo tratado com 0,1µg/mL, obteve aumento significativo na produção de óxido nítrico quando comparado ao estimulado com LPS e aos demais grupos. O tratamento com 10µg/mL com o veneno de *Tityus serrulatus*, apontou aumento na produção de óxido nítrico em relação ao grupo estimulado com LPS e as demais concentrações do veneno.

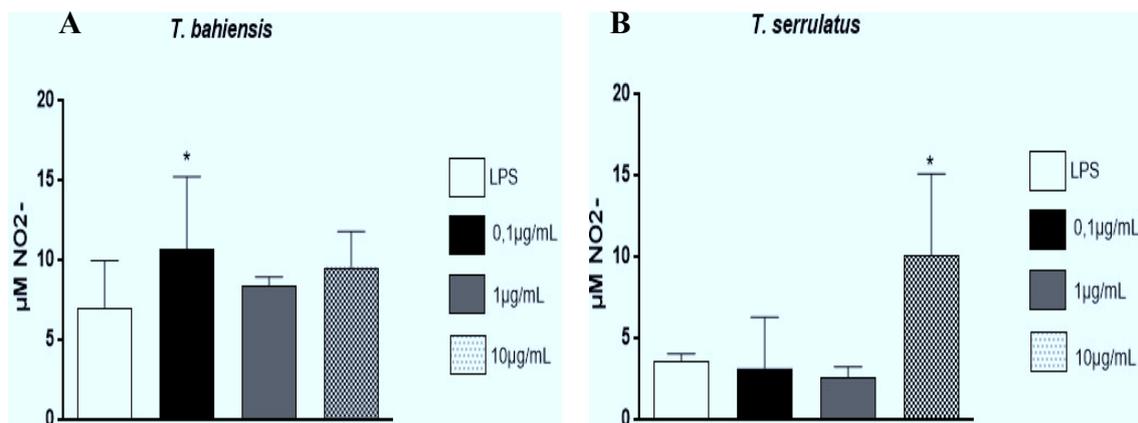


Gráfico 6. Efeito do veneno na produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7. Os macrófagos foram estimulados com LPS por 2 horas e em seguida com as concentrações 0,1, 1 e 10 μg/mL do veneno bruto de *Tityus bahiensis* (Gráfico 6A) e *Tityus serrulatus* (Gráfico 6B). O sobrenadante foi coletado para a dosagem de NO. Os resultados expressam a média ± desvio padrão e $P < 0,05$ quando comparado ao grupo estimulado com *LPS. Lipopolissacarídeo*.

6.7. Dosagem das citocinas IL-6 e TNF- α pelo método de ELISA

A dosagem de citocinas foi realizada no sobrenadante da cultura de macrófagos Raw 264.7 com as concentrações de 0,1, 1 e 10 μg/mL dos venenos bruto de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* após 24 horas de incubação. Dosaram-se as concentrações de citocinas através do método de ELISA. Nossos resultados, demonstraram que a produção de IL-6 nos grupos tratados com o veneno de *Tityus bahiensis* foi maior em comparação aos controles e a concentração de 0,1 μg/mL destacou-se em relação aos demais grupos. Para os grupos com o veneno de *Tityus serrulatus* não houve produção da IL-6 nas concentrações testadas.

Em relação a produção de TNF- α , houve menor produção desta citocina pelo grupo com o veneno de *Tityus serrulatus* na concentração de 0,1, 1 e 10 μg/mL, apresentando diferença significativa comparada aos grupos controles. O grupo com o veneno de *Tityus bahiensis* obteve maior produção nas concentrações 0,1 e 10 μg/mL, porém não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Os resultados evidenciaram que a produção de citocinas foi maior nos grupos com o veneno de *Tityus bahiensis* diferente dos grupos com o veneno de *Tityus serrulatus* com menor produção.

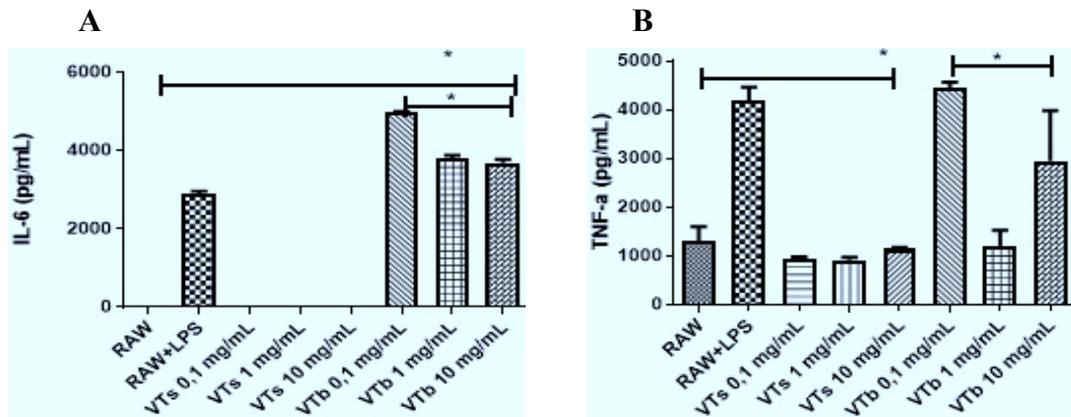


Gráfico 7. Efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* nos níveis de IL-6 e TNF- α . Os macrófagos foram estimulados com LPS por 2 horas e em seguida com as concentrações 0,1, 1 e 10 μ g/mL do veneno bruto de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão e $P < 0,05$ *mostra diferença significativa entre os grupos marcados do veneno de *Tityus bahiensis*.

7. DISCUSSÃO

A utilização de produtos extraídos a partir da biodiversidade animal tem se tornado alvo de vários estudos. O homem faz uso dessa matéria prima há séculos com a finalidade de garantir sua própria sobrevivência, que por sua vez extrai da natureza alimentos e insumos para produção de medicamentos (HENDERSON, 2012).

Toxinas de animais peçonhentos, tem se destacado como uma grande fonte de pesquisa, as quais tem despertado um grande interesse tanto para a produção terapêutica, quanto para a obtenção de novos fármacos (DUFOURC *et al.*, 2012). Algumas dessas toxinas como, por exemplo, a margotixina isolada da peçonha do escorpião *Centruroides margaritatus* é utilizada no tratamento de adenocarcinoma de pulmão humano (JANG *et al.*, 2011).

O presente trabalho buscou investigar a citotoxicidade dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* sobre macrófagos murinos e monócitos humanos. Os resultados evidenciaram que o veneno de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* não apresentaram efeito citotóxico para macrófagos RAW 264.7, mesmo em concentrações crescentes (Gráfico 1). Zoccal *et al.*, (2011) avaliou as toxinas Ts1, Ts2 e Ts6 presentes no veneno de *Tityus serrulatus*, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL, ele demonstrou ativação de macrófagos e a produção de mediadores imunes, com exceção da concentração de 100mg / mL, onde foi observado a redução da viabilidade celular. Diferente desses estudos, utilizamos concentrações de venenos bem menores, sendo possível observar que não houve atividade citotóxica nas concentrações com veneno de *Tityus bahiensis*.

Atualmente existem inúmeros trabalhos descritos sobre o efeito do veneno de *Tityus serrulatus* utilizando macrófagos murinos com o propósito de investigar a ação de toxinas, efeitos citotóxicos, ativação celular, produção de citocinas entre outros Petricevich *et al.*, (2008). Contudo na literatura pouco se sabe sobre a ação do veneno de *Tityus bahiensis* em células humanas. Nesse trabalho, investigamos também a toxicidade *in vitro* dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* sobre monócitos humanos

Os venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* não apresentaram citotoxicidade para monócitos humanos nas concentrações de 0,1,1e 10µg/mL (Gráfico

2). O mesmo foi observado por Casella-Martins (2011), utilizando a espécie de *T. serrulatus*. Este testou a atividade do veneno bruto de *Tityus serrulatus* sobre linfócitos T humanos e mostrou que quando realizado o ensaio com concentrações maiores, (500µg/mL, 1000µg/mL e 2000µg/mL) ocorreu a diminuição da viabilidade em PBMC. Quando avaliado o veneno de *Tityus serrulatus* nas concentrações menores como 25, 50 e 100µg/mL, foi observado leve diminuição da viabilidade demonstrando baixo efeito citotóxico para as células de PBMC.

Os macrófagos são de suma importância contra infecções por patógenos, tais como as bactérias, essas células desempenham funções importantes como a fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias na resposta imune do organismo. E para realizarem a fagocitose destes patógenos é necessário o auxílio de opsoninas como proteínas do sistema complemento e anticorpos. Já a eliminação do microrganismo invasor é feita através da produção de espécies reativas de oxigênio e uma série de enzimas proteolíticas que possuem alta atividade microbicida (LEE *et al.*, 2013 e WEISS *et al.*, 2015).

Recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu trabalhos utilizando o veneno de *Tityus serrulatus* com a finalidade de demonstrar sua capacidade regulatória. Maciel *et al.*, (2014) demonstraram que camundongos com sepse quando tratados com o veneno de *Tityus serrulatus*, modulam a resposta inflamatória via mecanismos de auto-regulação, mediado por IL-10, levando a diminuição da inflamação, aumentando a sobrevivência dos animais.

Nesta pesquisa, investigamos se a atividade microbicida de macrófagos infectados com bactérias era potencializada quando estes eram estimulados previamente com venenos bruto de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*.

O gráfico 3, mostra o efeito dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* na atividade microbicida de macrófagos infectados com *Escherichia coli* onde observou-se aumento desta atividade em todos os grupos estimulados com o veneno quando comparados ao controle e estimulados com LPS.

Na literatura já é descrito que o veneno de *Tityus serrulatus* é capaz de induzir a ativação celular e conseqüentemente a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (ZOCCAL *et al.*, 2011 e ZOCALL *et al.*, 2013). Essas citocinas são fundamentais na resposta imune às infecções por bactérias gram-negativas, seja no estímulo a migração celular para o local da infecção, ativação

de macrófagos, ou da liberação de espécies reativas de oxigênio (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009 e NETEA *et al.*, 2010). Além disso, estudos recentes demonstram que o reconhecimento do veneno bruto de *Tityus serrulatus* e da toxina Ts1 por macrófagos, acontece via TLR4 e quando ocorre a interação entre os peptídeos do veneno com o receptor da célula, uma cascata gênica é ativada que induz liberação de mediadores inflamatórios (ZOCCAL *et al.*, 2014), tal receptor celular é o mesmo que reconhece o lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas, uma vez que, essa interação receptor/PAMPs é essencial na resposta imune as infecções por patógenos desse gênero (FERRAZ *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que bactérias como *Escherichia coli*, são capazes de polarizar macrófagos para um perfil M1 pelo reconhecimento do LPS via TLR4, onde essas células possuem características efetoras, como a produção de citocinas inflamatórias, durante as infecções por esses patógenos (BENOIT *et al.*, 2008, MARTINEZ & GORDON, 2014), dessa forma podemos sugerir que o veneno bruto de *Tityus serrulatus* seja capaz de estimular a polarização de macrófagos murinos para um perfil M1 antes da infecção, uma vez que o reconhecimento do veneno bruto acontece via TLR4, e conseqüentemente potencializando a atividade microbicida dessas células, como representado na imagem abaixo (ZOCCAL *et al.*, 2014)

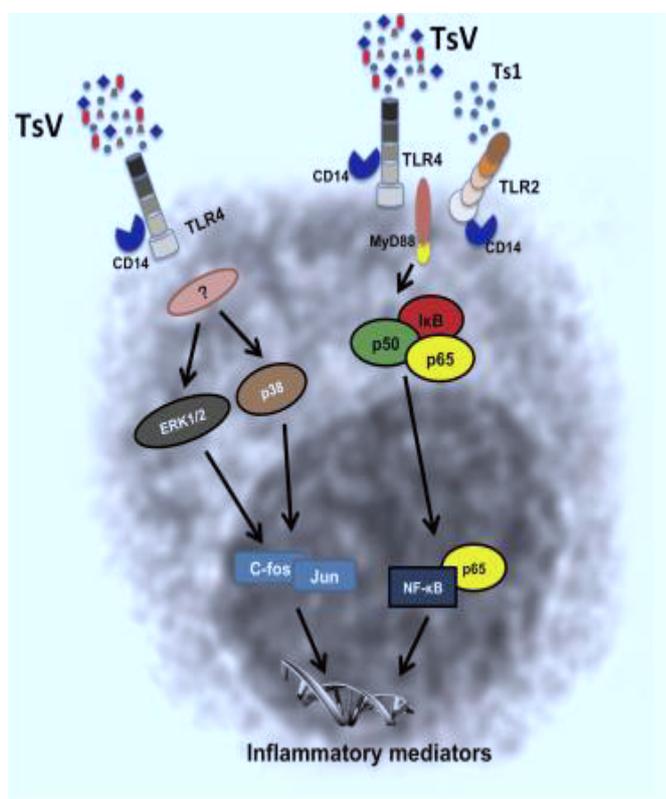


Figura 3. Demonstração esquemática do mecanismo de ação do veneno de *Tityus serrulatus* sobre macrófagos. Reconhecimento do veneno de *Tityus serrulatus* por vias TLR2 e TLR4 resulta na produção de mediadores inflamatórios.

No gráfico 4, todas as concentrações do veneno de *Tityus serrulatus* foram capazes de estimular a atividade microbicida dos macrófagos infectados com *Enterococcus faecalis*. Segundo Zoccal *et al.*, (2014), o reconhecimento do veneno e da toxina Ts1 por macrófagos se dá através dos receptores de superfície da membrana TRL4 e TRL2, que por sua vez resultam na ativação de NF-kB para gerar IL-6 e TNF- α . Esses receptores reconhecem os padrões moleculares de bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente, assim sugere-se que o estímulo foi capaz de preparar os macrófagos previamente na resposta a infecção pelo patógeno, potencializando a atividade bactericida. Ressaltamos ainda, que nos resultados para *Enterococcus faecalis* todas as concentrações foram capazes de aumentar a atividade microbicida dos macrófagos corroborando também com os achados para *Escherichia coli*.

Em relação *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), (gráfico 5), observa-se que a atividade citotóxica é maior quando comparado ao grupo controle quando tratado com o veneno de *Tityus bahiensis* na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (gráfico 5A), quando tratados o veneno de *Tityus serrulatus* observa-se aumento do efeito citotóxico na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, (gráfico 5B). Nossos dados demonstram o veneno de *Tityus bahiensis* que a concentração 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ do veneno de *Tityus serrulatus* estimularam aumento na atividade microbicida em relação ao controle, vale enfatizar que em alguns estudos já foi relatado que as menores concentrações de produtos de origem animal são capazes de causar efeitos diversos, muitas vezes relacionados a baixa citotoxicidade como no caso do veneno bruto de *Tityus serrulatus* (ZOCAL *et al.*, 2011) ou a simples capacidade de estimular a atividade fagocítica dos macrófagos.

É importante ainda ressaltar, que o efeito de concentrações menores não se aplica apenas aos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*, extratos vegetais com potencial terapêutico são um bom exemplo, já foi mostrado a diminuição na taxa de infecção por *Leishmania amazonensis* em macrófagos murinos tratados com baixas concentrações de *Chenopodium. ambrosioides* (JUNIOR *et al.*, 2014) além do aumento na produção da citocina inflamatória IL-1 β por células estimuladas com baixas concentrações de própolis (SOUZA *et al.*, 2014). Nesse contexto, a menor concentração na qual trabalhamos foi capaz de aumentar a capacidade microbicida frente a infecção por uma bactéria gram-positiva resistente a meticilina.

Em processos infecciosos causados por bactérias, macrófagos são ativados e passam a produzir óxido nítrico sendo este, um poderoso agente microbicida. Assim realizamos a dosagem de NO em culturas estimuladas previamente com LPS e em seguida adicionamos diferentes concentrações dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* às culturas de macrófagos.

No gráfico 6 observa-se aumento na produção de NO dependente da concentração do veneno 0,1 µg/mL de *Tityus bahiensis* e 10µg/mL, de *Tityus serrulatus* em relação aos demais grupos. Zoccal *et al.*, (2011), utilizaram macrófagos murinos J774.1 e estimularam as células com veneno bruto de *Tityus serrulatus* e as toxinas Ts1 e Ts2 e Ts6 nas concentrações de 25, 50 e 100µg/mL, onde o veneno bruto proporcionou a maior produção de óxido nítrico quando estimulado antes com LPS. Petricevich *et al.*, 2007 realizam lavado peritoneal em camundongos Balb/c para obtenção dos macrófagos e em seguida estimularam as células com 50µg/mL da toxina Ts1 e observaram o pico de NO em 72 horas após o estímulo. Diferente desses estudos, utilizamos macrófagos RAW 264.7 e concentrações do veneno bem menores, sendo possível ainda ver o efeito do veneno na produção de NO que foi dependente da concentração de 0,1 µg/mL do veneno de *Tityus bahiensis* e 10µg/mL do veneno de *Tityus serrulatus*. É provável que esse aumento deve ter sido por conta do maior reconhecimento do LPS e do veneno via TLR4 pelas células como já foi mencionado acima, além disso, na literatura já é descrito que a ligação dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de bactérias por receptor Toll (FERRAZ *et al.*, 2011) e veneno de *Tityus serrulatus* estimula a produção de TNF- α (ZOCAL *et al.*, 2011) e que está citocina age de forma autócrina nos macrófagos para induzir a produção de óxido nítrico (NO).

Diante da diversidade de pesquisas relacionadas a ação dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*, concluímos nossa avaliação, quantificando também a produção de citocinas, a partir dos sobrenadantes de macrófagos estimulados com LPS exposto aos venenos dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*.

As citocinas representam uma classe de compostos diferentes em termos de origem e função, além de serem fundamentais para o funcionamento adequado da resposta imune inata e adaptativa. Esse grupo de proteínas são de fundamental importância nos processos de comunicação entre as células (MTODZIKOWSKA-ALBRECHT *et al.*, 2007). Zoccal *et al.* (2011) demonstraram que o veneno escorpiônico

pode estimular a liberação de citocinas, principalmente em casos de envenenamento severo.

Em nossas condições experimentais encontramos aumento na produção de duas citocinas IL-6 e TNF- α (Gráfico 7AB). Quando analisamos a produção de citocina IL-6 (Gráfico 7A), nos grupos estimulados com LPS e exposto ao veneno de *Tityus bahiensis*, foi percebido aumento da sua produção na concentração de 0,1 μ g/mL, quando comparados ao grupo controle (Raw+LPS) seguido das seguintes concentrações (1 e 10 μ g/mL) que tiveram uma produção de IL-6 discretamente menor. Nos grupos com o veneno de *Tityus serrulatus*, não houve produção de IL-6 nas concentrações testadas. Diferente dos nossos achados Casella-Martins (2011) dosou IL-6 a partir do sobrenadante de cultura de PBMC na presença de fitohemaglutinina (PHA) e concentrações de 25, 50 e 100 μ g/mL e demonstrou que, nas concentrações de 100 e 50 μ g/mL evidenciou-se aumento na produção de IL-6, sugerindo que o aumento da produção citocina depende da concentração do veneno que está sendo testada.

Nossos resultados também mostraram que cultura de células estimuladas com LPS e expostas aos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* nas concentrações 0,1, 1 e 10 μ g/mL foram capazes de estimular a produção de altas concentrações de TNF- α (Gráfico 7B). Demonstrando que o veneno de *Tityus bahiensis* obteve maior produção de TNF- α na concentração de 0,1 μ g/mL quando comparado aos grupos controles, incluindo grupo Raw+LPS. Com relação ao veneno de *Tityus serrulatus*, foi observado baixa produção de TNF- α , quando comparado aos grupos controle e aos demais grupos com o veneno de *Tityus bahiensis*.

Com base nos dados obtidos, o veneno bruto de *Tityus serrulatus* foi capaz de aumentar a atividade microbida de macrófagos, produção de NO e somente o veneno de *Tityus bahiensis* estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α . Dessa forma, como perspectivas futuras, pretendemos ainda realizar a quantificação das citocinas após a infecção com as bactérias, para melhor elucidação dos mecanismos microbicidas destas células associados a estas substâncias.

8. CONCLUSÃO

- Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o veneno de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* não apresentou toxicidade para macrófagos RAW264.7 em nenhuma das concentrações testadas.
- A utilização dos venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* nas concentrações de 0,1, 1 e 10µg/mL não induziram efeito citotóxico para monócitos humanos.
- Os venenos brutos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* foram capazes de potencializar a atividade microbicida de macrófagos infectados com *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* em todas as concentrações.
- Em relação a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, os venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* apresentaram efeito citotóxico nas concentrações de 0,1 µg/mL (vTb) e 10µg/mL (vTs), respectivamente.
- Os venenos de *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* proporcionaram aumento na produção de óxido nítrico na concentração de 0,1 µg/mL (vTb) e 10µg/mL (vTs), respectivamente.
- O veneno de *Tityus bahiensis* adicionado a cultura de macrófagos nas concentrações 0,1, 1 e 10µg/mL, induziu a produção IL-6 e TNF-α com maior pico nas concentrações de 0,1µg/mL. O veneno de *Tityus serrulatus* não induziu a produção de IL-6, induzindo apenas a produção de TNF-α.

REFERÊNCIAS

AFACAN, J. N.; YENNG, T.Y.A.; PENA, O.M.; HANCOCK, R.E.W. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 6, p. 807-819, 2012.

ALMAAYTAH, A., & ALBALAS, Q. Peptides Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review. **Peptides**, v.51, p.35–45. 2013.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage polarization in bacterial infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733-3739, 2008.

BORGES, A.; BERMINGHAM, E HERRERA, N.; ALFONZO, MJ; SANJUR, O.I. Sistemática molecular do gênero neotropical escorpião *Tityus* (Buthidae): The historical biogeography and venom antigenic diversity of toxic Venezuelan species. **Toxicon**, v. 55, p. 436-454, 2010.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scandinavian **Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 21, n. 1, p. 77-89, 1968.

BOURA, M.C.R. **A imunomodulação do pigmento malárico (hemozoína) aumenta a susceptibilidade para infecções bacterianas disseminadas?** Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes. Universidade de Lisboa; Faculdade de Medicina de Lisboa, 130 p. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 812 p. 2014 Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/06/guia-vigilancia-saude-atualizado-05-02-15.pdf>. Acesso em: 10 de julho de 2016.

CASELLA-MARTIS, A. Investigação de efeito imunomoduladores de veneno de *Tityus serrulatus* sobre função de linfócitos T. Dissertação de Mestrado. **Biociências e Aplicadas Farmácia**. Ribeirão Preto, 63 p. 2011.

COELHO-CASTELO, A.A.M.; TROMBOME, A.P.F.; ROCHA, C.D.; LORENZI, J.C.C Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 42, n. 2, p. 127-142, 2009.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

CUPO, P. M.; AZEVEDO MARQUES, M.M; OLIVEIRA, J.S.; HERING, S.E. Escorpionismo grave no Brasil. Clínicos, laboratoriais e anatomopatológico aspectos.

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, v. 36, p. 67-76, 1994.

CUPO, P. M.; AZEVEDO MARQUES-, M.M.; HERING, SE Escorpionismo. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos do Brasil:** biologia, clínica e terapêutica dos Acidentes. 2. ed. São Paulo: Sarvier, p. 198-208. 2009.

DAVIES J, DAVIES D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews:** MMBR, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DING, H.; NATHAN, Carl F.; STUEHR, DENNIS J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412. 1988.

DUFOURC, E.; BOCHOUX, S.; TOUPÉ, J.; SANI, E.; FRANCOIS, F. J.; KHEMTMOURIAN, L.; GRÉLARD, A.; LOUDET-COURRÉGES, C.; LAGUERRE, M.; ELEZGARAY, J.; DESBT, B.; ODAERT, M. Membrane Interacting Peptides: From Kellres to Helperes. **Current Protein and Peptide Science**, v.13, n.7, 2012.

FIALHO, E.M.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, A.C.B.; REIS, A.S.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; FORTES, T. S.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N.M.; KWASNIEWSKI, F. H.; NASCIMENTO, F.R. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, v.58, p. 480-485, 2011.

FERRAZ, E.G.; SILVEIRA, B.B.B.; SARMENTO, V.A.; SANTOS, J.N. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)**, v. 59, n. 3, p. 483-490, 2011.

GUO, X.; MA, C.; DU, Q.; WEI, R.; WANG, L.; ZHOU, M.; CHEN, T.; SHAW, C.; Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1784-1794, 2013.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

HENDERSON, D.F. Permacultura: como Técnicas, **O Espaço, um e o natureza homem.** Monografia (Bacharelado em Ciências Sociais) Universidade de Brasília, Brasília, 87p. 2012.

JANG, S. H.; CHOI S. Y.; RUY P. D.; LEE S. Y. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, vol. 651, Issues 1–3, 25, P. 26-32, 2011.

JUNIOR, J. A. C. L.; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; BEZERRA, J. L.; PATRÍCIO F. J. B.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. M.; NASCIMENTO, F. R. F. INIBIÇÃO DA INFECÇÃO *in vitro* DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis* POR

EXTRATO E FRAÇÕES DE *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 1, 2014.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

LEE, K. M.; YIN, C.; VERSCHOOR, C. P.; BOWDISH, D.M.E.; Macrophage Function Disorders. In: **els**, 2013.

LIU, G. Y. Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. **Pediatric Research**, v. 65, p. 71R-77R, 2009.

LOURENÇO, W.R. Scorpion Diversity and Distribution: Past and Present Patterns. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; POSSANI, L.D.; SCHWARTZ, E. & RODRIGUEZ DE LA VEGA, R.C. (Eds). **Scorpion Venoms**. Springer Reference, 28 may. 2015

MACIEL, C. G.; FIALHO, E. M. S.; GUERRA, R. N. M.; BORGES, V.M.; KWASNIEWSKI, F.H.; NASCIMENTO, F.R.F. *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice, **Toxicon**, V.89, p.1–8. 2014.

MAGALHÃES M.M.; PEREIRA, M.E.S.; AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; CAMPOLINA D.; BUCARETCHI F.; GAZZINELLI, R.T.; CUNHA-MELO, J.R. Serum levels of cytokines in patients venom by *Tityus serrulatus* scorpion Sting. **Toxicon**, v. 37, p. 1155-1164, 1999.

MARCUSSI, S.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; MAZZI, M.V. **Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismo de ação de suas toxinas**. FUNPECP, São Paulo, v.1, v.1, p. 3-119, 2011.

MARTINEZ, F.O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **Prime reports**, v.6 p.1-13. 2014.

MELO, E.D., ESTRELA, A.B., SANTOS, E.G., MACHADO P.R.L., FARIAS, K.J.S.; TORRES, T.M.; CARVALHO, E.; LIMA. J.P.M.S; SILVA-JUNIOR, A.A.; BARBOSA, E.G.; FERNADES-PEDROSA, M.F. Structural characterization of a novel peptide with antimicrobial activity from the venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus*: Stigmurin. **Peptides**, V.68, P.3–10. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Controle de Escorpiões. Ministério da Saúde. Brasília; 2009, p. 11-12.

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

MTODZIKOWSKA-ALBRECHT, J.; STEINBORN, B.; ZAROWSKI, M. Cytokines, epilepsy and antiepileptic drugs – is there a mutual influence? **Pharmacol Rep.**, v. 59. p. 129-138, 2007

NASCIMENTO JÚNIOR, E. B.; COSTA, K. A.; BERTOLLO, C. M. et al. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p.585-593, 2005.

NETEA, M.G.; SIMON, A.; VEERDONK, F.V.D.; KULLBERG, B.J.; VAN DER MEER, J.W. M.; JOOSTEN, L.A.B. IL-1b Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. **PLoS Pathogens**, v.6, 2010.

PETRICEVICH, V.L. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. **Mediators Inflammation**. 11 (1): 23-31; 2002.

PETRICEVICH, V. L. Cytokine and nitric oxide production following severe envenomation. **Current drug targets inflammation & allergy impact factor**. v.3, p. 325-332, 2004.

PETRICEVICH, V.L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory Effects of the *Tityus serrulatus* Venom on Murine Macrophage Functions *in Vitro*, **Mediators of Inflammation**. Oxford. v.24, p. 39-49, 2005.

PETRICEVICH, V. L.; REYNAUD, E.; CRUZ, A. H.; POSSANI, L. D. Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. **Clinical and Experimental Immunology**, v.154, p. 415-423, 2008.

PETRICEVICH, V.L. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. Review article. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 1-16, 2010.

PUCCA, M.B.; OLIVEIRA, F.N.; SCHWARTZ, E.F.; ARANTES, E.C. & LIRA-DASILVA, R.M. Scorpionism and Dangerous Species of Brazil. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; POSSANI, L.D.; SCHWARTZ, E. & RODRIGUEZ DE LA VEGA, R.C. (Eds). **Scorpion Venoms**. Springer Reference, 28 may. 20015

SAMY, R. P., GOPALAKRISHNAKONE, P., THWIN, M. M., CHOW, T. K. V, BOW, H., & YAP, E. H. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes, **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p. 650–659. 2007.

SILVA, R.A.B. **Hidróxido de calico associado à Clorexidina - Estudo em cultura de Células (RAW 264.7 e Cultura Primária de Célula de Linhagem esteobástica) e em Tecido Subcutânea de Camundongos. Avaliação da Atividade Antimicrobiana**. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto: FORP-Universidade de São Paulo, 92 p. 2007.

SOUZA, C.A.R.; CANDIDO, D.M.; LUCAS, S.M.; BRESCOVIT, A.D. Sobre o *Tityus stigmurus* complexo (Scorpiones, Buthidae). **Zootaxa**, v. 1987 p. 1-38, 2009.

TOPRAK, E.; VERES, A.; MICHEL, J. B.,; CHAIT, R.; HARTL, D. L. END KISHONY, R. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nature Genetics*, v.44, p.101-105, 2011.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U. E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. **Immunological reviews**, v. 264, n. 1, p. 182-203, 2015.

WONG, W. R.; OLIVER, A. G.; LININGTON, R. G. Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 11, p. 1483-1495, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. World Health Organization, 2014.

ZHANG, W.; LI, J.; LIU, L.; WANG, K.; SONG, J.; YAN, J. A novel analog of antimicrobial peptide Polybia-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice, **Peptides** v. 31, p.1832-8, 2010

ZOCCAL, K.F.; BITENCOURT, C.S.; SECATTO, A.; SORGI, C.A.; BORDON, K.C.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; FACCIOLI, L.H. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v.57, p. 1101–1108, 2011.

ZOCCAL, K.F.; BITENCOURT, C.S.; SORGI, C.A.; BORDON, K.C.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; FACCIOLI, L.H. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**, vol. 61, p. 1-10, 2013.

ZOCCAL, K. F. BITENCOURT, C.S.; PAULA-SILVA, F.W.G.; SORGI, C.A.; BORDON, K.C.F. ARANTES, E.C.; FACCIOLI, L.H. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PloS one**, v. 9, n. 2, 2014.

ZULIANI, J. P. FREITAS, T. A CONCEIÇÃO, I. M. KWASNIEWSKI, F. H. *Tityus serrulatus* venom increases vascular permeability in selected airway tissues in a mast cellindependent way. **Experimental and Toxicologic Pathology** 65 229-234, 2013.