



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MÁRCIA CRISTINA GONÇALVES MACIEL

Veneno de *Tityus serrulatus*: uma ferramenta biotecnológica na modulação do sistema imunológico

São Luís

2014



RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MÁRCIA CRISTINA GONÇALVES MACIEL

Veneno de *Tityus serrulatus*: uma ferramenta biotecnológica na modulação do sistema imunológico

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto focal Maranhão – da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de doutora em Biotecnologia

Orientadora: Prof^a.Dra. Flávia Raquel F. do Nascimento

São Luís

2014

Maciel, Márcia Cristina Gonçalves

Veneno de *Tityus serrulatus*: uma ferramenta biotecnológica na modulação do sistema imunológico / Márcia Cristina Gonçalves Maciel – 2014.
91 f.

Impresso por computador (fotocópia)

Orientadora: Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Maranhão, programa de pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, 2014

1. Imunologia 2. Veneno 3. Sepse 4. Inflamação

CDU 577.27

MÁRCIA CRISTINA GONÇALVES MACIEL

Veneno de *Tityus serrulatus*: uma ferramenta biotecnológica na modulação do sistema imunológico

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – Ponto focal Maranhão – da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de doutora em Biotecnologia

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa da tese de doutorado, em sessão pública realizada em 14 / 02/ 2014, considera a candidata Márcia Cristina Gonçalves Maciel **APROVADA**.

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Universidade Federal do Maranhão
Orientadora

Prof. Dr. Roberto Nicolete
Fundação Oswaldo Cruz - Rondônia
1º examinador

Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra
Universidade Federal do Maranhão
2º examinador

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão
3º examinador

LISTA DE FIGURAS		pg
Figura 01	Espécies de escorpiões do gênero <i>Tityus</i> , comuns no Brasil.	11
Figura 02	Mecanismo de disfunção cardíaca, causada pelo veneno de escorpião	19
Figura 03	Efeito do envenenamento na produção de citocinas e na progressão dos sinais culminando ao choque.	20
Figura 04	Resposta imune do hospedeiro à sepse caracterizada pelos padrões de resposta pró e anti-inflamatórios	26
Figura 05	Início da resposta imunológica após a infecção.	28
Figura 06	Esquema do modelo experimental de sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongo.	29
Figura 07	Patogenia do choque séptico.	32
Figura 08	Fagocitose e atividade microbicida realizada por neutrófilo.	33

LISTA DE QUADROS / TABELAS

		pg
Tabela 01	Medicamentos desenvolvidos a partir de venenos de animais	17
Quadro 01	Critérios diagnósticos para a sepse	22
Tabela 02	Padrões moleculares associados a patógenos, padrão moleculares associado ao perigo e seu reconhecimento por receptores Toll-like (TLR)	27
Tabela 03	Citocinas pró / anti-inflamatórias e suas funções na sepse	30

Sumário

	pg
1 Introdução	10 - 15
2 Referencial teórico	16 - 36
2.1 Veneno	16 - 17
2.1.1 Veneno de escorpião	17- 22
2.2 Sepsis e imunopatologia	22 - 36
Referências Bibliográficas	37 - 43
3 Capítulo 1 - Artigo 1 - Recrutamento de células imunológicas induzido pela administração do veneno de <i>Tityus serrulatus</i> e <i>Tityus bahiensis</i>	45 - 52
3.1 Capítulo 2 - Artigo 2 - Immune cells recruitment and activation by <i>Tityus serrulatus</i> scorpion venom	54 - 59
3.2 Capítulo 3 - Artigo 3 – <i>Tityus serrulatus</i> scorpion venom treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice	61-90
Conclusões	91

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua bondade, misericórdia e por ter permitido que eu chegasse até a defesa de tese do curso de doutorado, um grande sonho realizado. Toda honra e toda glória sejam dadas ao Senhor Jesus. Obrigada, meu Deus!

Agradeço à minha família, pelo incentivo e por proporcionar todas as condições possíveis para que eu defendesse minha tese de doutorado. João C. Maciel Neto, pai amado, guerreiro e exemplo a ser seguido. Maria S. Gonçalves Maciel, mãe querida, repleta de amor e dedicação à família. Meus pais, muito obrigada por todo o apoio que os senhores me concederam em toda a minha trajetória, por terem me dado apoio emocional e por terem investido na minha educação. Meu irmão querido João Marcos G. Maciel, por ser esse irmão amigo que está sempre torcendo por mim. Ao meu esposo Athos Queiroz de Moraes, o amor da minha vida, muito obrigada por toda a paciência, amor e dedicação que tens disponibilizado a mim e por manter a tranquilidade mesmo nos momentos mais difíceis. Família, eu os amo muito, pois mesmo em meio aos momentos mais complexos da minha vida vocês sempre me apoiaram incondicionalmente.

Agradecimentos à minha eterna, admirável orientadora e grande amiga de longas datas, Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, para mim “Flavinha”. Obrigada por ter acreditado no meu trabalho, por ser paciente, mas também rígida quando necessário, por ter se disponibilizado a me orientar desde a graduação até o doutorado, por ser uma profissional competente e uma fonte de inspiração para mim. Orgulho-me todas as vezes em que és premiada, pois a tua dedicação à ciência é exemplar e contagiante. Além disso, obrigada por poder contar com a tua amizade sincera que está sempre pronta a disponibilizar conselhos, emitir opiniões e sei que estás sempre torcendo por mim. Aprendi e continuo aprendendo muito com você. Só tenho a agradecer-te por tudo!

À Dra. Rosane Guerra, “professora Rosane”, profissional determinada, exemplar e guerreira, com quem tenho aprendido muito e adquirido experiência profissional e pessoal. Além disso, fui presenteada com sua amizade. Com a senhora aprendi a executar outras atividades que eu nem imaginava ter potencial para desenvolvê-las e consegui ultrapassar meus próprios limites. Tenho grande apreço e admiração pela pessoa que és. Obrigada por tudo!

À Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral, uma amiga muito querida, que sempre me recebeu com alegria, simpatia e com mensagens positivas. Admiro-te pela elegância sempre constante, pela força, coragem, dedicação à família e pela profissional brilhante que és. Obrigada pela frase que sempre me estimula a prosseguir: “Marcinha, vai dar tudo certo”!

Ao meu amigo Éder Fialho, que muito contribuiu nos experimentos envolvendo veneno e por ser um grande parceiro de trabalho. Além disso, agradeço a todos os LIFianos da equipe dos “venenosos” que colaboraram nos experimentos com o veneno de escorpião.

Ao Laboratório de Imunofisiologia (LIF) que é minha eterna família, por quem me sinto sempre acolhida e que me deixa orgulhosa em fazer parte dela. Sintam-se TODOS abraçados por mim! Com vocês, vivi momentos de amizade, diversão e profissionalismo, inesquecíveis.

À Suzanna, Éville e Lu agradeço a amizade desde a graduação em que vivemos momentos de estudos, alegrias e conquistas.

Amiga Lucilene, obrigada pela sua frase que sempre me animava quando eu pensava que não tinha mais forças: “Calma, logo verás o vento batendo no seu rosto de doutora”! Rs....

Meus sinceros agradecimentos às minhas amigas de doutorado, pois passamos por muitas emoções. Kátia Nascimento, uma amiga muito simpática, sempre alegre e elegante, forte, batalhadora, guerreira, empresária e pesquisadora. Admiro-te pela mulher eclética que és e pela competência no que fazes. Saiba que estou sempre torcendo por você e pelo teu sucesso. Alexandra Martins, uma amiga muito divertida, pois estar próximo a ela é garantia de muitas risadas. Ao mesmo tempo ela é uma grande profissional, pois foi premiada em 2013 pela sua tese de doutorado RENORBIO, parabéns, você merece. Desejo muito sucesso para nós!

Aos meus queridos amigos, Nayra/Rodrigo, Renato/Luciana, Patrick/Laís, Beto/Fabiana, Jônatas e Antenor, agradeço a amizade sincera, verdadeira e a companhia sempre divertida nos momentos de lazer. Com vocês a alegria e diversão são garantidas!

Aos professores que participaram minha banca de qualificação (Drs. Elizabeth Soares Fernandes, Rosane Nassar Meireles Guerra, Valério Monteiro Neto, Lidio Gonçalves Lima Neto-suplente, Ana Paula Silva Azevedo dos Santos-suplente) que contribuiu de forma brilhante com as devidas correções e/ou sugestões.

Aos professores que participaram da minha banca de defesa de tese, muito obrigada!

Ao Dr. Fábio Henrique Kwasniewski pelas grandiosas contribuições nos nossos trabalhos em parceria.

À faculdade Pitágoras, direção geral e coordenações pelo apoio e colaboração durante o doutorado.

Meus agradecimentos ao programa da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO.

Agradecimento especial às agências de fomento FAPEMA, CNPq, CAPES, Instituto Butantan e Fiocruz pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL- lavado broncoalveolar
CBA – citometria de fluxo
CLP – ligadura e perfuração cecal
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
IL - interleucina
IFN-γ – interferon gama
MCP - 1- proteína quimiotática de monócitos-1
TNF-α – fator de necrose tumoral alfa
TGF-β – fator de crescimento e transformação beta
NETs - rede extracelular de neutrófilo
PMA – acetato miristato de forbol
LPS – Lipopolissacarídeo
HMGB1 – proteína de alta mobilidade box-1
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
NO – óxido nítrico
UFC – unidade formadora de colônia
GM-CSF - fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
UTI – unidade de terapia intensiva
SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica
EBH – extrato bruto hidroalcolico
PRR – receptores de reconhecimento padrão
PAMP – padrões moleculares associados a patógenos
DAMP – padrões moleculares associados ao dano tecidual
TLR – receptores do tipo Toll
MyD88 – proteínas adaptadoras do tipo fator de diferenciação mielóide 88
AP-1 – fator de transcrição nuclear e proteína ativadora 1
MCP-1 – proteína quimiotática de monócito
PAF – fator ativador de plaquetas
ARDS – síndrome da angústia respiratória aguda do adulto
ERO – espécies reativas de oxigênio
ERONs – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ALI – injúria pulmonar aguda
ARDS – síndrome respiratória aguda
GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago
G-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos
m HLA – DR – antígeno leucocitário humano DR

RESUMO

Os escorpiões do gênero *Tityus* são de grande importância para a saúde pública do Brasil devido aos acidentes e a potencialidade de seu veneno em causar casos clínicos graves e às vezes fatais principalmente em crianças. O veneno destes aracnídeos induz uma resposta inflamatória, apresenta atividade antimicrobiana e, além disso, mantém a sobrevivência de animais com sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Os objetivos deste estudo foram: avaliar a cinética de ativação e migração celular, fazendo uma comparação entre os venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* em animais naïve (artigo 01); investigar o recrutamento de células para os órgãos linfóides, a ativação destas células e a produção de citocinas após estimulação com o veneno de *T. serrulatus* em animais naïve (artigo 02); e averiguar o efeito do veneno de escorpião *Tityus serrulatus* sobre o sistema imunológico de animais nos quais foi induzida a infecção polimicrobiana por ligadura e perfuração cecal - CLP (artigo 03). Os animais receberam os venenos de *T. serrulatus* ou *T. bahiensis*, via intraperitoneal e após 30, 120 e 360 minutos foram sacrificados para quantificação da celularidade nos órgãos linfóides (artigo 01). No artigo 02, os camundongos receberam apenas o veneno de *T. serrulatus* e após 30, 120 e 360 minutos, foram sacrificados para quantificação da celularidade nos órgãos linfóides, investigação da ativação celular e produção de citocinas. No artigo 03, os camundongos receberam veneno de *T. serrulatus* 6h antes da indução da sepse letal por CLP. Após 12h da indução de CLP, uma parte dos animais foi separada para o acompanhamento da sobrevivência e outra parte foi sacrificada, o sangue foi coletado para a contagem de plaquetas e obtenção de soro para determinação das concentrações de nitrito sérico e quantificação de citocinas. Foi feita a quantificação da celularidade dos órgãos linfóides e do lavado broncoalveolar por microscopia. O pulmão foi retirado para realização dos cortes histológicos para analisar o edema e o influxo de células para a cavidade pulmonar. A ativação celular também foi avaliada através da liberação de peróxido de hidrogênio pelas células peritoneais. O tratamento foi feito sempre na dose não letal de 200 µg/kg, via intraperitoneal ou subcutânea. Os resultados demonstraram que os venenos (*T. serrulatus* e *T. bahiensis*) interferem no recrutamento de células para os órgãos linfóides. O veneno de *T. serrulatus* induziu um aumento do número de neutrófilos sanguíneos e aumento de IL-6, TNF- α , IL-10, reduziu o número de células no peritônio e baço e promoveu um aumento do número de células no linfonodo. No experimento em que foi induzida CLP nos animais, o veneno impediu a morte dos camundongos com infecção polimicrobiana, reduziu o edema pulmonar, não reduziu citocinas inflamatórias. Houve um aumento de IL-6 e MCP-1 no lavado broncoalveolar. O aumento de IL-10 foi identificado no soro dos animais tratados com veneno nos quais a CLP foi induzida. O veneno é uma ferramenta biotecnológica importante na manutenção da sobrevivência de quadros infecciosos capazes de induzir óbito, pois estimula o sistema imunológico, induzindo a ativação celular com liberação de citocinas e de produtos microbicidas como, por exemplo, peróxido de hidrogênio. O veneno de escorpião é considerado uma importante fonte de substâncias que se constituem em matérias-primas ou protótipos para síntese de novos fármacos ou bioprodutos profilático de baixo custo para o controle de infecções, atuando como antimicrobiano e ao mesmo tempo fazendo a manutenção da resposta imunológica evitando a letalidade.

Palavras-chave: Imunologia, Veneno, Sepse, Inflamação.

ABSTRACT

The scorpions of the genus *Tityus* are really important to public health in Brazil due to accidents and venom's potentiality to cause serious clinical cases, and sometimes fatal, especially in children. The poison of these arachnids induces an inflammatory response, has antimicrobial activity and furthermore maintains the survival of animals with induced by cecal ligation and puncture (CLP) sepsis. The purpose of this study were: evaluate the kinetics of activation and cell migration by making a comparison between venoms (*T.serrulatus* and *T.bahiensis*) in naive animals (Article 01); investigate the recruitment of cells to the lymphoid organs, the activation of these cells and cytokine production after stimulation with the venom of *T. serrulatus* in naive animals (Article 02); and investigate the effect of *T. serrulatus* scorpion venom on the immune system of animals which was induced polymicrobial infection cecal ligation and puncture - CLP (Article 03). The animals received the poisons of *T. serrulatus* or *T. bahiensis*, intraperitoneally and after 30, 120 and 360 minutes were sacrificed for quantification of cellularity in lymphoid organs (Article 01). In Article 02, the mice received only the venom of *T. serrulatus* and after 30, 120 and 360 minutes were sacrificed for quantification of cellularity in lymphoid, investigation of cell activation and cytokine production organs. In Article 03, the mice received venom of *T. serrulatus* 6h before induction of lethal sepsis by CLP. After 12 hours of induction of CLP, a part of animals was separated for monitoring survival and another part were sacrificed, blood was collected for platelet count and obtain serum for determination of serum nitrite and quantification of cytokines. Quantification of cellularity of lymphoid organs and bronchoalveolar lavage was performed by microscopy. The lung was removed to perform the histological sections to analyze the edema and the influx of cells into the lung cavity. The activation was also assessed by the release of hydrogen peroxide by peritoneal cells. The treatment was always done in non-lethal dose of 200 µg/kg, intraperitoneal or subcutaneous injection. The results showed that the poisons interfere with recruitment of cells to the lymphoid organs. The venom of *T. serrulatus* led to an increased number of blood neutrophils and increased IL -6, TNF- α, IL-10 reduced the number of cells in the spleen and peritoneum associated with an increase in the number of cells in the lymph node. In the experiment in which CLP was induced in the animals, poison prevented death of mice with polymicrobial infection, reduced pulmonary edema, did not reduce inflammatory cytokines. There was an increase in IL-6 and MCP-1 in BAL. Increased IL-10 has been identified in the serum of treated animals in which the poison was induced by CLP. The poison is an important biotechnological tool in maintaining the survival of infectious conditions capable of inducing death, because it stimulates the immune system, inducing cell activation with release of cytokines and microbicidal products such as, for example, hydrogen peroxide. The scorpion venom is considered an important source of substances that constitute raw materials or templates for the synthesis of new drugs or prophylactic bioproducts low cost for the control of infections, acting as antimicrobial and at the same time maintaining the immune response avoiding lethality.

Keywords: Immunology, Poison, Sepsis, Inflammation.

OBJETIVOS DA TESE:

- Comparar o efeito dos venenos de *T. serrulatus* e *T. bahiensis* quando injetados em dose não letal, via i.p em camundongos.
- Avaliar a cinética da migração e ativação celular induzida pelos venenos das duas espécies de escorpião.
- Avaliar as alterações causadas pelo veneno de *T. serrulatus* nos órgãos linfóides, no recrutamento e ativação de células.
- Investigar a liberação de citocinas em animais que receberam veneno de *T. serrulatus*.
- Investigar o efeito da dose não letal do veneno de *T. serrulatus* em camundongos submetidos à infecção polimicrobiana por CLP.
- Investigar a sobrevivência dos animais que receberam o veneno e nos quais foi induzida a sepse.
- Quantificar a celularidade nos órgãos linfóides dos animais que receberam o veneno e nos quais foi induzida a sepse.
- Verificar se ocorre o edema pulmonar em animais sépticos tratados com veneno de *T. serrulatus*.
- Caracterizar a ativação celular de animais sépticos tratados com veneno.
- Averiguar a liberação de citocinas em animais tratados com veneno, nos quais a sepse foi induzida.

1. INTRODUÇÃO

Várias pesquisas de bioprospecção vêm sendo estimuladas com o objetivo de contribuir para a busca racional de bioprodutos, destacando substâncias biologicamente ativas de importância para a indústria farmacêutica. Estes estudos são fundamentais para a preservação do bioma brasileiro tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (Barreiro e Bolzani, 2009).

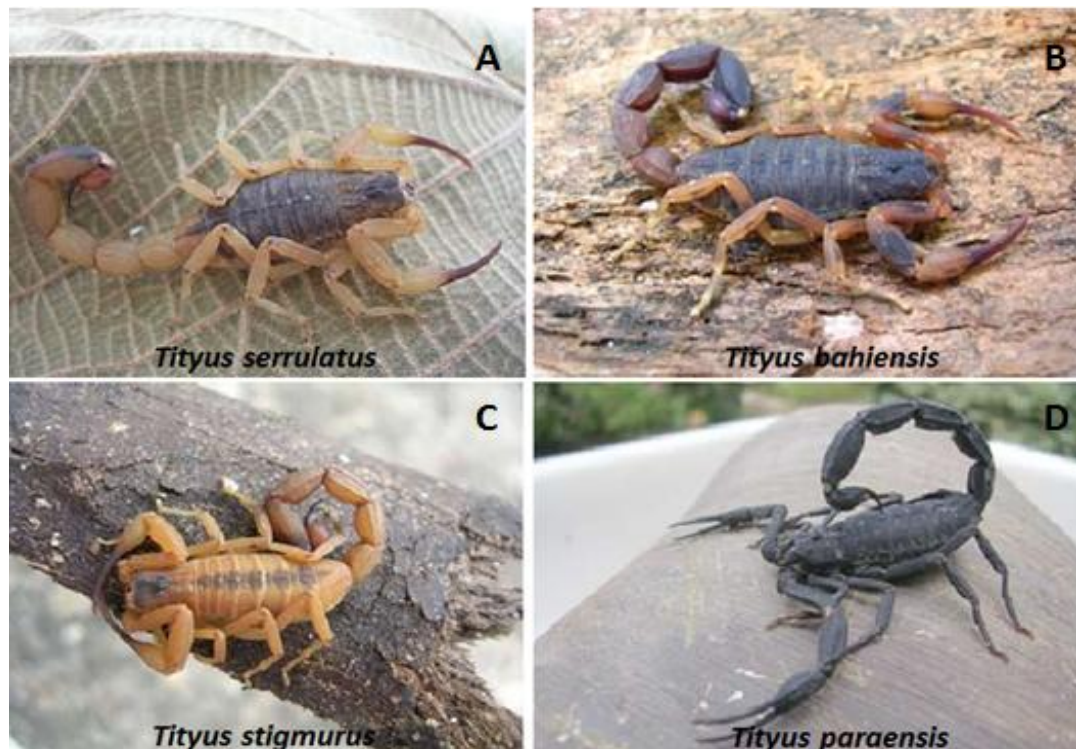
O veneno de escorpião é um produto natural composto de várias toxinas com diversas propriedades e ações toxicológicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Dentre as toxinas, a Ts1 β -NaTx é uma das mais importantes, pois ela altera a modulação dos canais de Na⁺, mantendo-os na posição ativada (Cestèlle e Catterall, 2000); ativa macrófagos e estimula a liberação de interleucinas IL-1, IL-6 e TNF (Petricevich, 2002; Petricevich et al., 2007); induz a liberação de catecolaminas e aumenta a pressão arterial (Vasconcelos et al., 2005).

Das 1.600 espécies conhecidas no mundo, apenas 25 são consideradas de interesse em saúde, fazem parte do filo Arthropoda, vivem em locais de clima tropical, possuem exoesqueleto e são muito adaptados ao ambiente urbano, onde têm alimentação farta e sem competição. No Brasil existem cerca de 160 espécies de escorpiões e as responsáveis pelos acidentes graves pertencem ao gênero *Tityus*, que tem como característica, entre outras, a presença de um espinho sob o ferrão (Bücherl, 1969).

São conhecidas sete famílias de escorpião. A família mais importante é a Buthidae, devido ao número de espécies e pelo veneno produzido por estes aracnídeos representada no Brasil pelo gênero *Tityus* (Soleglad e Fet, 2003).

As principais espécies capazes de causar acidentes graves são: *Tityus serrulatus*, *Tityus bahiensis*, *Tityus stigmurus*, *Tityus obscurus* / *Tityus paraenses*, representados na figura 01.

Figura 01: Espécies de escorpiões do gênero *Tityus*, comuns no Brasil. A) *T. serrulatus*, ou escorpião amarelo, responsável pela maioria dos acidentes graves; B) *T. bahiensis* conhecido como escorpião marrom; C) *T. stigmurius*, apresenta uma faixa escura longitudinal na parte dorsal; D) *T. paraensis*, escorpião preto característico da região Amazônica.



O Escorpião amarelo (*T. serrulatus*) é a espécie brasileira de maior importância médico científica. Possui pernas e cauda amarelo-claro e a porção inferior do final da cauda apresenta coloração escura. Ainda, possui como característica, a presença de uma serrilha no 3° e 4° segmento da cauda (figura 01 A). Mede até 07 cm de comprimento. Esta espécie ocorre na Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo, Sergipe, Rio Grande do Sul e Paraná.

O Escorpião marrom (*T. bahiensis*) apresenta o tronco escuro, pernas e palpos com manchas escuras e cauda marrom-avermelhada (figura 01 B). Não possui serrilha na cauda, e o adulto mede cerca de 07 cm. Ocorre na Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

O Escorpião amarelo do Nordeste (*T.stigmurus*) mede de 06 a 07 cm, possui pernas, tronco e cauda amarelo-claro. Assemelha-se ao *T. serrulatus* nos hábitos e na coloração, porém apresenta uma faixa escura longitudinal na parte dorsal do seu mesossoma, seguido de uma mancha triangular no prossoma (figura 01 C). Outra característica é uma mancha escura na parte inferior do último segmento da cauda e uma serrilha no 3° e 4° anéis da cauda. É encontrado no Nordeste, Paraná e Santa Catarina.

O Escorpião da Amazônia possui coloração preta, por vezes um pouco avermelhada e pode chegar a 09 cm de comprimento. Quando jovem, o corpo e os apêndices são castanhos e apresentam manchas escuras. É considerada espécie sinônima de *Tityus paraensis* (Lourenço e Leguin, 2008) (figura 01 D).

Dentre estes, descritos acima, o escorpião da espécie *Tityus serrulatus* é o mais prevalente e envolvido em mais de 95% dos acidentes (Soares et al., 2002).

Estudos recentes relatam a eficácia dos produtos obtidos de vegetais e animais, em relação ao prognóstico do quadro de sepse letal induzida em camundongos, diferente do que ocorre quando esses animais que são tratados com fármacos (Yun et al.,2009; Wang et al., 2006).

Yun et al., (2009), descreveram que que *Aloe vera* mantém a sobrevivência dos animais nos quais foi induzida a sepse por CLP (ligadura e perfuração cecal). A administração de *Aloe vera*, via intravenosa, na dose de 50 mg/kg, controlou o quadro de síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, atenuou a produção de citocinas, TNF - α , IL - 1β , e IL - 6. A administração in vivo de *Aloe vera* controlou a proliferação bacteriana. Os nossos sugeriram que a *Aloe vera* pode apresentar um potencial efeito terapêutico para o tratamento clínico de sepse.

Wang et al., (2006) descreveram que o extrato de *Angelica sinensis* contém componentes solúveis em água que exercem efeitos protetores contra endotoxemia letal (LPS, 15 mg/kg, via intraperitoneal em camundongos BALb/C) e sepse experimental (CLP em camundongos BALb/C), em parte, atenuando o acúmulo sistêmico da proteína de alta mobilidade box-1 (HMGB1) que é considerada uma citocina de fase tardia, relacionada à diminuição da sobrevivência.

O laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão vem desenvolvendo diversos projetos utilizando produtos naturais nos modelos de sepse. Dentre os resultados até agora alcançados, podem ser destacados:

1. “Eficácia do tratamento profilático com extrato bruto hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* e da fração hexânica na sepse induzida por ligadura e perfuração cecal”. Neste trabalho, os animais da linhagem Swiss foram tratados 6h antes da sepse letal, induzida por CLP. O extrato bruto induziu o aumento do número total de células peritoneais quando comparado aos demais grupos, enquanto que o grupo que recebeu a fração apresentou uma redução significativa do número de células quando comparado ao grupo Controle. Os grupos extrato bruto e fração apresentaram maior liberação de H₂O₂ e NO quando comparados ao controle. Apenas o grupo tratado com a fração apresentou redução no número de UFCs bacterianas no sangue. Este trabalho mostrou que o tratamento profilático com *C. ambrosioides* induziu uma resposta imunológica eficaz frente à infecção bacteriana promovida pela CLP (Rios et al., 2012). Recentemente o uso de composições farmacêuticas à base do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. com potencial anti-inflamatório originou uma patente (Nascimento et al., 2012).

2. “Atividade antimicrobiana do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu (*Attalea speciosa* Mart.) em modelo experimental de sepse. Neste trabalho, os animais foram tratados 6h após a sepse letal, induzida por inoculação de cepa bacteriana (30 x 10⁸ UFC/mL de *Staphylococcus aureus*) na cavidade peritoneal. O extrato aquoso do mesocarpo de babaçu bruto manteve a sobrevivência dos animais em relação ao grupo controle, alterou a celularidade nos órgãos linfoides, induziu a liberação de óxido nítrico pelas células do peritônio e reduziu o número de UFCs bacterianas no sangue. O tratamento terapêutico com *Attalea speciosa* Mart. induziu uma resposta imunológica eficaz frente à infecção bacteriana promovida pela sepse letal induzida pela inoculação de *S. aureus* (Souza et al., 2011).

3. Artigo publicado em 2008 na Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine, intitulado “*Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice”. A sepse letal (CLP) foi induzida em camundongos C57BL/6.

Os animais foram tratados previamente (6h antes da CLP) com o extrato de *Syzygium jambolanum*. O tratamento profilático manteve a sobrevivência dos camundongos, induziu a migração de neutrófilos para foco infeccioso, promoveu o espriamento de células, a liberação de peróxido de hidrogênio, a redução do nitrito sérico e induziu a redução da liberação de TNF. Apesar do aumento da migração e ativação de células peritoneais estimuladas pelo extrato, o tratamento não diminuiu o número de UFCs bacterianas. O tratamento com *S. jambolanum* tem um potencial em controlar o quadro infeccioso não associado a um efeito microbicida direto, mas sim a um processo de recrutamento de neutrófilos ativados para o foco infeccioso e uma resposta inflamatória sistêmica controlada (Maciel et al., 2008).

Em resultados prévios, o nosso grupo mostrou atividade antimicrobiana in vitro do veneno de escorpião *T. serrulatus*, produto natural de origem animal, contra as cepas bacterianas (ATCC's), *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (Manuscrito em preparação).

Os antibióticos são utilizados até hoje para o tratamento de pacientes com sepse, porém estas drogas induzem alterações cardiovasculares, mas não atuam na inflamação desencadeada pelos patógenos, desequilibrando assim a homeostase do organismo. Esses medicamentos causam efeitos colaterais graves e os microrganismos se tornam resistentes a eles. Além disso, esses fármacos atuam diretamente nas bactérias, promovendo a lise do microrganismo, a liberação de toxinas e não são capazes de induzir uma resposta imunológica sincronizada, ou seja, em equilíbrio.

Sabendo do potencial efeito dos produtos naturais, este trabalho propõe a avaliação de um bioproduto com eficácia sobre os sinais e/ou sintomas da sepse, mantendo a sobrevivência dos animais de uso experimental mesmo frente ao quadro de infecção letal induzido pelo modelo de ligadura e perfuração cecal em camundongos.

Os resultados serão apresentados em 03 capítulos dispostos em formato de artigos científicos. O primeiro capítulo trata do efeito dos venenos de escorpião sobre o recrutamento de células para os órgãos linfoides. Os resultados deste estudo foram publicados em 2011 na Revista de Ciências da Saúde, com o título "**Recrutamento de células imunológicas induzido pela administração do veneno de *Tityus***

serrulatus e Tityus bahiensis”, um estudo comparativo entre os efeitos dos venenos de duas espécies de *Tityus*. O segundo capítulo é um estudo que descreve o recrutamento e a ativação de celular, induzido por veneno de *T. serrulatus*, intitulado **“Immune cell recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom”**. Este artigo também descreve o potencial imunoestimulador do veneno de *T. serrulatus* e seus efeitos sobre o influxo de neutrófilos na circulação, a liberação de citocinas em vários intervalos. Foi publicado na revista *Toxicon* também em 2011. O terceiro capítulo intitulado **“*Tityus serrulatus* scorpion venom treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice”** mostra o efeito do veneno de *Tityus serrulatus* na sobrevivência de animais com sepse a partir da infecção polimicrobiana, induzida pelo modelo denominado CLP (ligadura e perfuração cecal). Este capítulo foi submetido ao *Journal of Leukocyte Biology*.

Venenos de animais contêm compostos biologicamente ativos que despertam um considerável interesse para a produção de novos fármacos. Espera-se que através dos estudos de bioprospecção, sejam utilizadas técnicas de purificação, clonagem e expressão gênica via microrganismos modificados para a produção de um peptídeo recombinante do veneno de escorpião ou vários deles simultaneamente contribuindo para a preservação da espécie deste aracnídeo. Estas técnicas contribuirão para que através do veneno de *T. serrulatus* sejam originados novos compostos químico/farmacêuticos patenteáveis, capazes de ativar células imunológicas e ao mesmo tempo induzir a expressão de citocinas regulatórias, fundamentais para a manutenção da homeostase nos quadros de sepse letal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO:

2.1. VENENO:

Os venenos de animais têm sido amplamente reconhecidos como uma das principais fontes de moléculas bioativas (Omar, 2013). Theakston e Kamiguti, 2002 listaram mais de 2500 toxinas de animais e outros produtos naturais que demonstraram atividade biológica. Este número tende a aumentar, uma vez que, o número de moléculas pode chegar de 50 a 300 em cada veneno embora muitas delas ainda sejam desconhecidas (Stocklin et al., 2000; Pimenta et al., 2001; Pimenta et al., 2005; Nawarak et al., 2003). Essa riqueza de constituintes pode ser útil para a biotecnologia na prospecção de novos fármacos ou novos constituintes químicos a serem usados como terapêuticos.

A classificação das toxinas pode ser feita através da função de sua natureza química (proteínas, glicoproteínas, peptídeos, alcaloides, poliaminas), seus efeitos farmacológicos ou biológicos (neurotoxinas, peptídeos vasoativos, hemolítico, citolítico, antitumoral, analgésico, antimicrobiano), seus efeitos moleculares (ligantes de canais iônicos, inibidores enzimáticos) e finalmente com base no seu sítio de ligação sub-molecular - α e β toxinas para o veneno que se liga nos sítios 3 e 4 dos canais de sódio (Pimenta e De Lima, 2005). As α -toxinas ligam-se aos canais iônicos retardando sua inativação e prolongando a fase de repolarização do potencial de ação. As β -toxinas são neurotoxinas que agem mudando a dependência de voltagem da ativação dos canais de sódio para um potencial mais negativo (Cestèle e Catterall et al., 2006; Campos et al., 2007).

Desde o desenvolvimento do anti-hipertensivo que possui como princípio ativo um peptídeo isolado do veneno da *Bothrops jararaca* (Captopril®), outros medicamentos derivados de peptídeos de venenos de animais já foram liberados para comercialização. Na tabela 1 encontram-se listados os primeiros fármacos produzidos a partir de peptídeos de animais venenosos.

Venenos e toxinas de artrópodes constituem ricas fontes de moléculas com um elevado potencial biotecnológico e terapêutico, uma vez que muitos deles têm receptores, membranas e enzimas como alvos moleculares primários. A utilização de abordagens proteômicas e espectrometria de massa deu uma nova dimensão à toxinologia, possibilitando a descoberta de novos peptídeos bioativos negligenciados

por causa de sua baixa toxicidade ou por causa da falta de detecção e caracterização de suas atividades biológicas. Apenas recentemente, tem sido dada atenção relacionada ao potencial biotecnológico destes peptídeos e isto se deve ao aumento de pesquisas relacionadas à prospecção e caracterização destas moléculas e o reconhecimento da indústria farmacêutica de que os venenos de animais são uma fonte valiosa de novos fármacos (Pimenta e Lima, 2005).

Tabela 01. Medicamentos desenvolvidos a partir de venenos de animais.

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

Fonte: Pimenta e Lima, 2005.

2.1.1 Veneno de escorpião:

O veneno do escorpião é constituído de mucopolissacarídeos, hialuronidase, fosfolipase, serotonina, histamina, peptídeos e proteínas neurotóxicas que são responsáveis por sintomas característicos. Lira-da-Silva et al., 2000 descreveram as principais manifestações clínicas em pacientes picados por escorpião *T. stigmurius*. A maioria dos pacientes apresentaram como distúrbio local, dor e dormência; distúrbio geral, a cefaléia e sudorese; distúrbios digestivos, vômito e náusea; distúrbios neurológicos: tremor, agitação e dificuldade de locomoção; distúrbios cardiovasculares: hipotensão; distúrbios respiratórios: dispnéia. Devido à presença de proteínas com atividade hialuronidásica, o veneno se difunde rapidamente ao local de

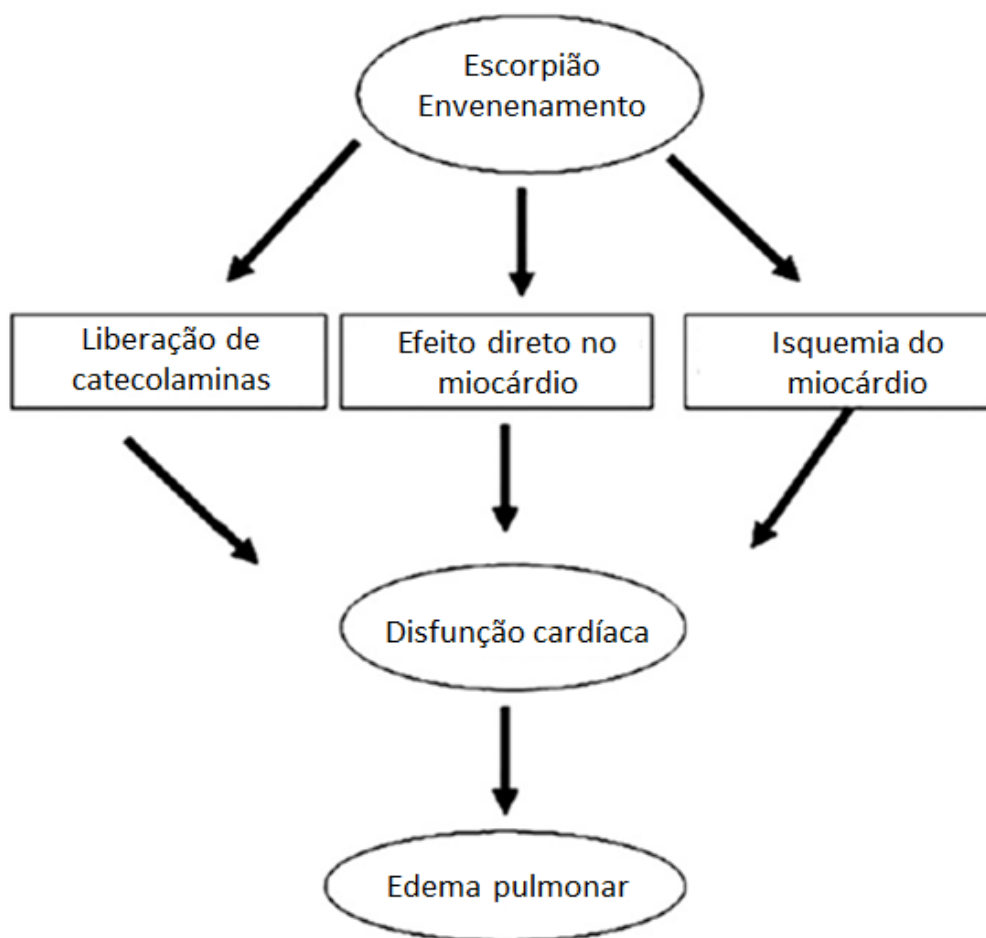
inoculação para o sangue e atinge diferentes tecidos em curto intervalo de tempo. (Santana et al. 1996).

Os acidentes ocasionados por picada de escorpião podem levar ao envenenamento letal em humanos, especialmente em crianças. Os sintomas começam dentro de poucos minutos após a picada progredindo para uma severidade máxima dentro de cinco horas. Manifestações cardio-respiratórias, choque cardiogênico e, principalmente, edema pulmonar, são as principais causas de morte após o acidente escorpiônico.

Peres et al., (2009) descreveram o efeito da injeção intramuscular de veneno do escorpião *T. serrulatus* em relação à inflamação pulmonar. O veneno induziu o aumento da elastância, redução da pressão resistiva, aumento da inflamação pulmonar caracterizado pelo aumento da densidade de células mononucleares e polimorfonucleares o que culminou em lesão pulmonar aguda.

O edema pulmonar tem sido atribuído à falência ventricular esquerda aguda. A insuficiência cardíaca pode resultar de liberação maciça de catecolaminas, dano miocárdico induzido pelo veneno ou isquemia do miocárdio. Os fatores geralmente associados com o diagnóstico de edema pulmonar foram: idade jovem, taquipnéia, agitação, suores, ou na presença de concentrações elevadas de proteína no plasma (Bahloul et al, 2013). A patogênese do edema pulmonar induzido pelo veneno escorpiônico é muito complexa sendo decorrente dos mecanismos cardiogênicos e não cardiogênicos. Amaral et al., 1993 descreveram que dentre os fatores cardiogênicos incluem-se hipertensão arterial, aumento do retorno venoso e insuficiência do miocárdio, descritos na figura 02. Os mecanismos não cardiogênicos são consequência da liberação de substâncias vasoativas que podem levar ao aumento da permeabilidade vascular (De Matos et al., 1997).

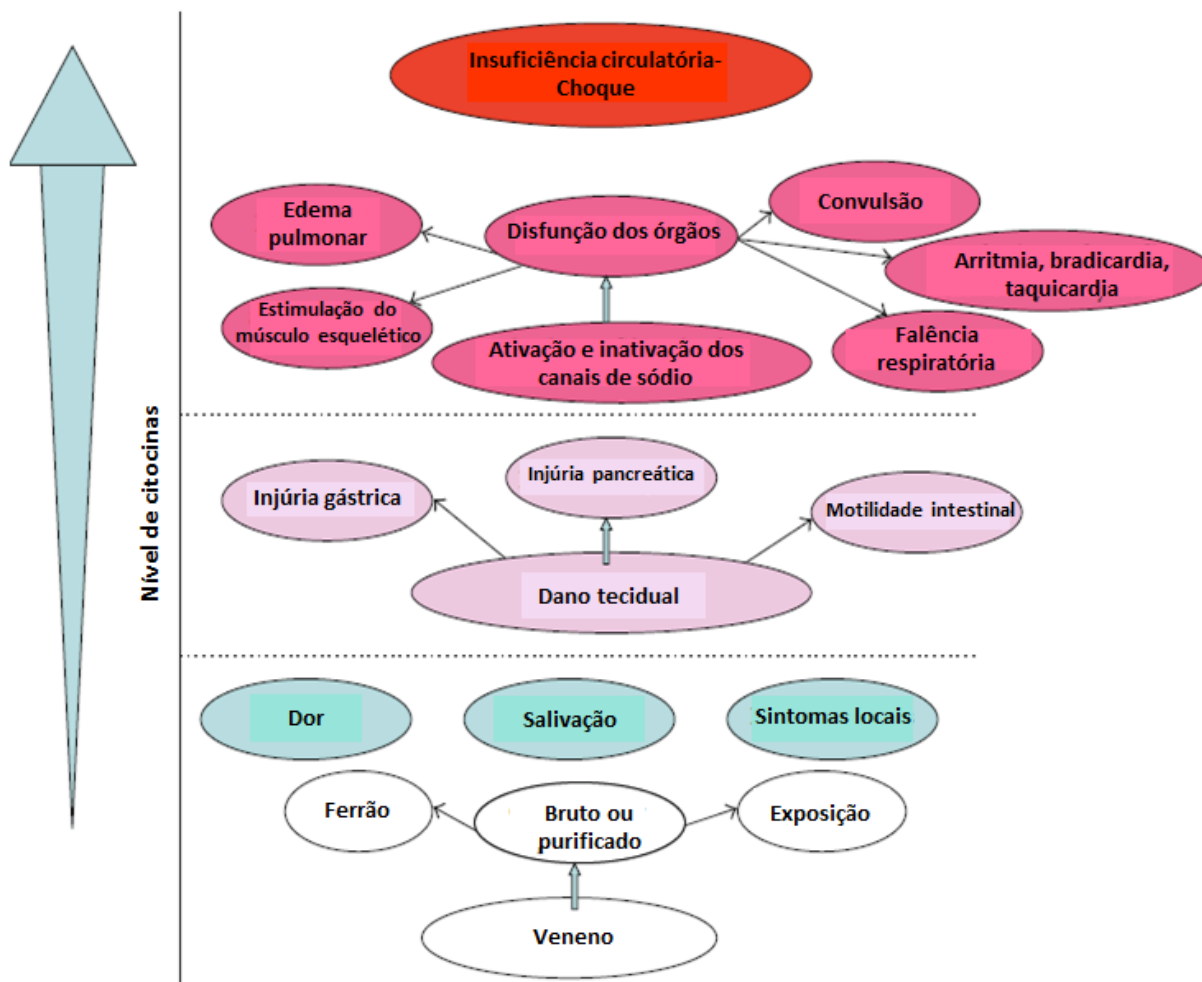
Figura 02: Mecanismo de disfunção cardíaca, causada pelo veneno de escorpião.



Fonte: Bahloul et al., 2013

Durante respostas locais e sistêmicas induzidas pelo veneno de escorpião são observadas a liberação de citocinas e metabólitos do ácido araquidônico, proteínas da cascata de coagulação e do sistema complemento. Os mediadores envolvidos no envenenamento por veneno por *T. serrulatus* são: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, NO, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ e GM-CSF. Além disso, o envenenamento pode levar à lesão tecidual, que ocorre durante a inflamação, à disfunção múltipla de órgãos e choque vascular. A figura 03 representa os acontecimentos mediante ao contato com o veneno bruto ou com peptídeo isolado, citando as principais consequências como dano tecidual e disfunção dos órgãos associado à progressiva liberação de citocinas, culminando em choque.

Figura 03: Efeito do envenenamento na produção de citocinas e na progressão dos sinais culminando ao choque.



Fonte: Petricevich, 2010

O veneno de escorpião é uma rica fonte de diferentes classes de peptídeos representando ferramentas para pesquisas biológicas (Cusinato et al., 2010) e diferentes estudos vêm caracterizando a ação biológica do veneno de escorpião. Os mesmos serão discutidos a seguir:

Segundo Petricvich, 2002, macrófagos estimulados *in vitro* pelo veneno de *T. serrulatus* e IFN- δ , tornam-se ativados, liberando peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.

A fração do veneno de *T. serrulatus* (T1 – TyTx), inoculada em ratos Wistar, na dose 250 mg/kg, via intravenosa, ativa a reposta inflamatória, aumentando do número de neutrófilos sanguíneos (Borges et al. 2000).

Zoccal et al., 2011 descreveram o potencial do veneno de escorpião *T. serrulatus* e suas frações (Ts1, Ts2 e Ts6) em induzir a ativação de macrófago e a produção de mediadores imunológicos.

Zuliani et al., 2013 demonstraram que o veneno de *Tityus serrulatus* provoca edema nas vias aéreas de ratos Wistar, independente da ativação do mastócito.

Fialho et al., 2011 demonstraram que os venenos de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* interferem no recrutamento de células dos órgão linfóides em curto tempo e, além disso, descreveram que o veneno de *T. serrulatus* induz inflamação local, aumento de neutrófilos sanguíneos e aumento na produção de citocinas séricas (TNF- α , IL-6 e IL-10).

Petricevich et al., 2007 inocularam via intraperitoneal 50 μ g/camundongo, via intraperitoneal, de Ts1 (toxina gama) e observaram que os animais apresentaram sinais clínicos de intoxicação como salivação, tremor e diarreia. Macrófagos peritoneais de camundongos foram estimulados in vitro com os constituintes fracionados do veneno de *T. serrulatus* (Ts1), 50 μ g/poço, sendo possível acompanhar a cinética de produção das citocinas IL1 α e β , IL-6, TNF- α (nas primeiras horas- 12 a 24h) e IL-10 (a partir de 72h com pico na 120h).

O veneno de *T. serrulatus* e a toxina purificada TsTx-1, induziram congestão hepática com hemólise, degeneração hidrópica, edema pulmonar, hipertrofia das fibras com degeneração cardiovascular, congestão e hemorragia renal. Além disso, é comum a leucocitose com aumento de citocinas séricas (IL-1, IL-6, TNF) e catecolaminas (Becerril et al., 1997; Correa et al., 1997; Pessini et al., 2003).

O peptídeo bactridina, isolado do veneno de *Tityus discrepans* apresentou efeito bactericida sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas devido a vários mecanismos, dentre eles a alteração da permeabilidade de canal de sódio comprometendo o balanço eletrolítico da membrana e do citosol destes microrganismos (Díaz et al. 2009).

Um peptídeo isolado do escorpião mexicano *Hadrurus aztecus*, demonstrou efeito antimicrobiano contra as cepas bacterianas *Salmonella thyphi*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* (Torres-Larios, 2000).

2.2. SEPSE E IMUNOPATOLOGIA:

A Síndrome séptica é uma das principais causas de óbito em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). A patogênese da sepse inclui inúmeros distúrbios no sistema imunológico. O processo inicia-se com a presença do microrganismo em um tecido específico, podendo se disseminar para a circulação sanguínea. Inicialmente ocorre uma resposta inflamatória local a qual evolui para a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), onde a presença do patógeno na circulação não é identificada, mas sim sinais como leucocitose ou leucopenia ($>12 \times 10^9/L$ ou $<4 \times 10^8/L$), febre ou hipotermia ($>38,3^\circ C$ ou $<36^\circ C$), alteração da frequência cardíaca (≤ 90 batimentos/min) e frequência respiratória (≥ 20 incursões/min), presença da formação de coágulos (coagulação intravascular disseminada). O microrganismo pode se proliferar e migrar para a circulação sanguínea promovendo o quadro de sepse, que se caracteriza por dois ou mais sinais da SIRS associados à presença de microrganismo e/ou seus produtos no sangue. O quadro 02 lista os principais critérios diagnósticos para a sepse, detalhando a progressão do quadro, desde a SIRS até o choque séptico, que se caracteriza por sepse severa associada à hipotensão, hipoperfusão, oligúria, falência múltipla dos órgãos, culminando no óbito (Martin, 2012).

Quadro 01: Critérios diagnósticos para a sepse.

SIRS	Febre ou hipotermia ($>38,3^\circ C$ ou $<36^\circ C$) Frequência cardíaca (>90 batimentos/min) Frequência respiratória ($>20/min$) Leucocitose ou leucopenia ($>12 \times 10^9/L$ ou $< 4 \times 10^8/L$) Coagulação intravascular disseminada
SEPSE	Resposta Sistêmica a Infecção (2 ou mais sintomas da SIRS + evidência de infecção)
SEPSE SEVERA	Sepse associada com disfunção de órgãos ou hipoperfusão ou hipotensão ou oligúria
CHOQUE SÉPTICO	Sepse associada com hipoperfusão, hipotensão, oligúria.

Fonte: Riedemann et al, 2003; Martin, 2012; King et al, 2014.

São vários os relatos de produtos naturais com potencial profilático e/ou terapêutico no tratamento de infecções. De fato, Maciel et al. (2008) demonstraram que um produto natural, extrato bruto hidroalcolico (EBH) obtido das folhas de *Syzygium jambolanum*, manteve a sobrevivência dos animais nos quais a sepse foi induzida por CLP (ligadura e perfuração cecal). O mesmo resultado não foi observado quando os animais eram tratados ou não com antibiótico. O EBH de *S. jambolanum* induziu a liberação de peróxido de hidrogênio, porém diminuiu os níveis séricos de óxido nítrico e fator de necrose tumoral quando comparados ao grupo Controle. Da mesma forma, uma espécie vegetal utilizada na medicina chinesa tradicional, Liu-Shen-Wan, reduziu a mortalidade por sepse decorrente de CLP (ligadura e perfuração cecal) em camundongos (Ma et al., 2006). Estes efeitos foram relacionados à limitação da resposta inflamatória sistêmica e a alterações imunológicas no sítio infeccioso primário.

Borges et al. (2006) descreveram a atividade contra a leishmaniose em experimento *in vitro* quando incubada em concentrações variadas de veneno de *Tityus discrepans*. Segundo Petricovich, 2002, macrófagos estimulados *in vitro* pelo veneno de *T. serrulatus* e IFN- γ , apresentaram-se ativados, liberando peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Segundo Borges et al., 2000, o veneno desse aracnídeo induz uma resposta inflamatória, apresentando um aumento do número de neutrófilos sanguíneos após a injeção da fração do veneno de *T. serrulatus*.

Estima-se que 40% dos medicamentos comercializados são desenvolvidos de fontes naturais (Simões et al., 2003). Aproximadamente 60% das drogas antitumorais, antiparasitárias, antibacterianas e antivirais comercializadas ou na fase dos testes clínicos são de origem natural (Shu, 1998). Diante do potencial do veneno descrito e da real necessidade em encontrar um fármaco ou bioproduto capaz de eliminar ou inibir a atividade de microrganismos potencialmente causadores de infecção e ao mesmo tempo atuar sobre o sistema imunológico, existe a necessidade de continuação dos estudos para a avaliação do efeito do veneno de escorpião, além de validar a eficácia dos peptídeos deste produto em modelos de infecção polimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, como por exemplo, nos modelos de sepse em camundongos.

A sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica complexa, decorrente de uma infecção não controlada. O desenvolvimento e a progressão da

sepse são multifatoriais, afetando os sistemas cardiovascular, endócrino e imunológico. Devido a essa complexidade o estudo clínico e a terapêutica são sempre mais difíceis (Martin, 2012).

A falta de medicamentos mais eficazes faz com que a sepse continue sendo um grande desafio tanto para cientistas quanto para clínicos. Assim, a sepse severa e o choque séptico são as causas principais de morbidade e mortalidade pacientes hospitalizados e em indivíduos imunossuprimidos (McPherson et al, 2013).

Em 2000, a síndrome séptica era responsável por mais mortes que o infarto agudo do miocárdio, sendo então classificada como a décima principal causa de morte (Kenneth et al., 2004). Os quadros que normalmente evoluem para óbito são os de pneumonia severa e infecção intra-abdominal, tal como peritonite e bacteremia induzida por dispositivos cirúrgicos (Eggimann e Pittet 2001; Vincent et al., 2006). Jawad et al. (2012) realizaram um estudo de revisão de literatura relatando a sepse como um problema de saúde significativo, mesmo em países desenvolvidos, acometendo cerca de 20-30 milhões de pacientes mundialmente por ano. Mundialmente, a cada hora, cerca de 1.000 pessoas e, a cada dia, por volta de 24 mil pessoas morrem de sepse, com mais de 08 milhões de vidas perdidas anualmente. Apesar de todas estas informações, a sepse é uma das doenças menos conhecidas. No mundo em desenvolvimento, a sepse é responsável por 60-80% de vidas perdidas na infância, com mais de 06 milhões de recém-nascidos e crianças afetadas pela sepse anualmente. Além disso, é responsável por mais de 100 mil casos de sepse materna a cada ano e, em alguns países, atualmente é uma ameaça maior durante a gravidez do que as hemorragias ou tromboembolismo (Reinhart et al., 2013).

Segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (2013), no Brasil, a mortalidade é alta chegando a 65%, enquanto que a média mundial está em torno de 30 a 40%.

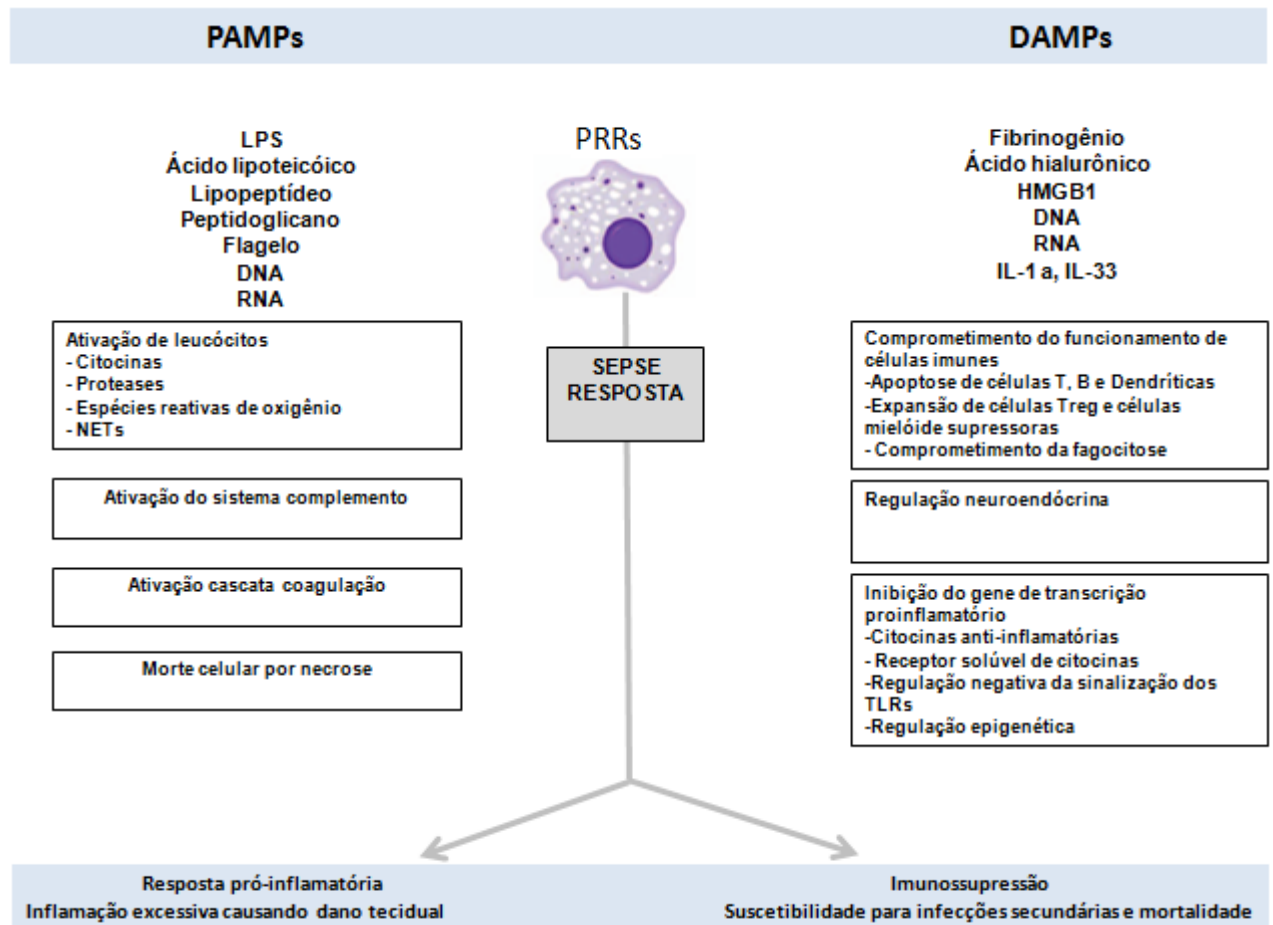
Estudos sobre os tipos de microrganismos causadores da sepse têm evoluído ao longo dos anos. Originalmente, a sepse foi descrita como uma patologia relacionada às bactérias Gram-negativas, isto porque a sepse era considerada uma resposta à endotoxina. Entretanto, pesquisas epidemiológicas mais recentes divulgaram que nos últimos 25 anos, as bactérias Gram-positivas têm sido a causa

mais comum da sepse. Atualmente é descrito na literatura que a sepse é causada por qualquer tipo de antígeno bacteriano, fúngico ou viral (Martin, 2012).

A resposta imune inata ocorre inicialmente via receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Estes receptores se ligam aos componentes antigênicos dos patógenos, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além disso, os receptores PRRs podem sinalizar a presença de algum estímulo nocivo devido à sua habilidade para reconhecer mediadores endógenos durante a injúria, tal como trauma, isquemia ou necrose.

As respostas inflamatórias são iniciadas pela interação entre PAMPs e PRRs expresso por células imunes do hospedeiro. A inflamação exacerbada com dano tecidual e morte celular por necrose resultará na liberação de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs) que podem perpetuar a inflamação em curso. A resposta pró-inflamatórias é aumentada por ativação de leucócitos, ativação do sistema complemento e da cascata de coagulação. A resposta imune anti-inflamatória, por sua vez, depende da regulação da liberação de mediadores, da regulação neuroendócrina e inibição da transcrição de genes pró – inflamatórios (figura 04).

Figura 04: Resposta imune do hospedeiro à sepse caracterizada pelos padrões de resposta pró e anti-inflamatórios.



Fonte: Wiersinga et al., 2013

Os receptores do tipo Toll (TLRs), são considerados fundamentais no reconhecimento de PAMPs. Estes receptores participam de reações inflamatórias através da ativação de vias de sinalização mediada pelas proteínas adaptadoras do tipo fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e Toll / receptor de IL-1. O fator de transcrição nuclear e proteína ativadora 1 (AP-1) são ativados resultando na transcrição de genes inflamatórios. TLRs também reconhecem moléculas endógenas denominadas padrão moleculares associado ao dano (DAMPs), que são liberadas durante estresse e lesão celular. Este reconhecimento é crucial nas respostas inflamatórias do tipo estéril não infecciosa, característica de processos como trauma e isquemia. A tabela 02 descreve os tipos de Toll que se ligam aos PAMPs e DAMPs.

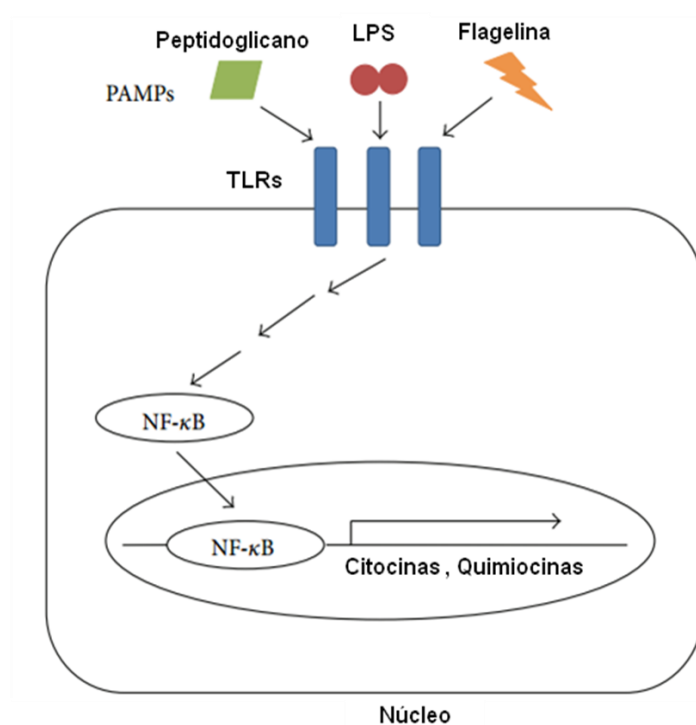
Tabela 02: Padrões moleculares associados a patógenos, padrão moleculares associado ao perigo e seu reconhecimento por receptores Toll-like (TLR)

	Espécies	TLR
PAMPs em bactéria		
Lipopolissacarídeo	Bactéria Gram negativa	TLR 4
Ácido lipoteicóico	Bactéria Gram positiva	TLR 2
Peptidoglicano	Maioria das bactérias	TLR 2
Triacil lipopeptídeos	Maioria das bactérias	TLR 1 ou TLR 2
Diacil lipopeptídeos	<i>Mycoplasma</i> spp.	TLR 2 ou TLR 6
Porinas	Neisseria	TLR 2
Flagelina	Bactérias flageladas	TLR 5
CpG DNA	Todas as bactérias	TLR 9
Desconhecido	Bactérias Uropatogênicas	TLR 11
PAMPs em fungo		
Zymozan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR 2 ou TLR 6
Fosfolipomanana	<i>Candida albicans</i>	TLR 2
Manana	<i>Candida albicans</i>	TLR 4
Resíduos de manose O-ligado	<i>Candida albicans</i>	TLR 4
B-glucana	<i>Candida albicans</i>	TLR 2
DAMPs		
Proteínas de choque térmico	Hospedeiro	TLR 4
Fibrinogênio, fibronectina	Hospedeiro	TLR 4
Ácido hialurônico	Hospedeiro	TLR 4
HMGB 1	Hospedeiro	TLR 4, TLR 2

Fonte: Van der Poll e Opal, 2008

A tabela 02 especifica alguns tipos de Toll que interagem com os PAMPs de bactéria ou fungo, produzindo assim uma resposta imunológica com a participação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, promovendo a liberação de citocinas e quimiocinas (figura 05).

Figura 05: Início da resposta imunológica após a infecção. As células imunológicas reconhecem o patógeno através dos receptores do tipo Toll (TLR). Ocorre a ligação do PAMP (peptidoglicano, LPS e flagelina) ao TLR iniciando a cascata de transdução culminando na ativação do NF- κ B.



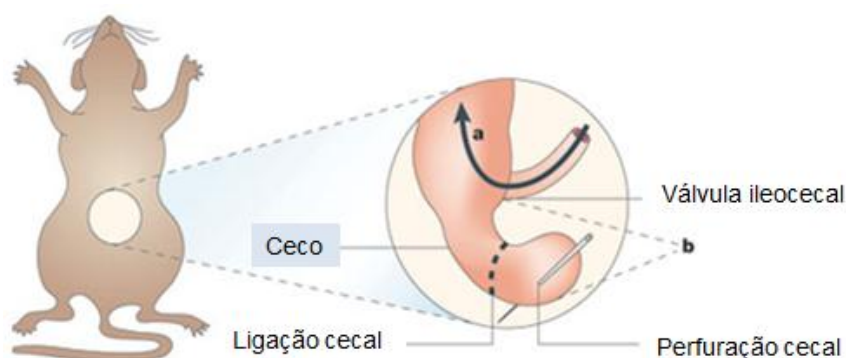
Fonte: Schulte et al., 2013

Os modelos animais são utilizados para reproduzir o que ocorre em humanos, para o desenvolvimento de testes preliminares, na tentativa de se desenvolver medicamento e alvos (Buras et al., 2005). Os modelos experimentais de sepse conhecidos são: administração endovenosa ou intraperitoneal de bactérias vivas ou de componentes microbianos e os modelos de injúria com consecutiva liberação da microbiota intestinal (ligadura e perfuração cecal – CLP ou introdução de cateter no cólon ascendente).

O modelo utilizado neste trabalho foi o de CLP (Figura 06), por ser um modelo de sepse que mais se assemelha à sepse humana decorrente de perfurações das alças

intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal (agulha calibre 18 G), ocorre a liberação gradativa do conteúdo cecal para a cavidade peritoneal, ocasionando peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico. Apesar de ter sido desenvolvido há trinta anos, o modelo de CLP em roedores tem sido amplamente utilizado como modelo experimental, sendo considerado padrão ouro de sepse, pois é um modelo realista de infecção polimicrobiana em configurações experimentais para estudar mecanismos subjacentes da sepse. O ceco é uma fonte endógena de microrganismos e a perfuração do mesmo resulta em peritonite, seguida de translocação desses microrganismos para a circulação sanguínea. Quando o modelo CLP é usado em roedores, os sinais clínicos se apresentam nos animais da mesma forma que em humanos ocasionando taquicardia, hipotermia e taquipnéia (Wichterman et al., 1980; Benjamim, 2001; Buras et al., 2005; Rittirsch et al., 2007).

Figura 06: Esquema do modelo experimental de sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongo.



Fonte: Buras et al., 2005.

A resposta inflamatória sistêmica tem sido reconhecida como fator proeminente na mortalidade induzida pela sepse (Calandra e Cohen, 2005). As manifestações clínicas da sepse, tais como febre, hipercoagulação e hipotensão periférica são derivadas da liberação de mediadores inflamatórios e citocinas tais como IL-1 β , IL-6, IL-17, TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13, IL-8, IL-10, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e proteína quimioatática de monócito (MCP-1). As funções de algumas citocinas mais importantes durante a sepse estão descritas na tabela 03. (Lvovschi et al., 2011; Burkovskiy et al., 2013).

Tabela 03: Citocinas pró / anti-inflamatórias e suas funções na sepse.

Citocinas inflamatórias	Função na sepse
TNF - α	Promove inflamação, induz a expressão de moléculas de adesão endoteliais. Atua sinergicamente com IL-1 para promovendo a inflamação inicial.
IL1- β	Potente indutor de moléculas de adesão endotelial para o recrutamento celular. Envolvida na sinalização, podendo ativar a liberação de NO pelas células endoteliais e pelas células da musculatura lisa.
IL-6	Importante mediador de febre e respostas imunes da fase aguda, envolvido na diferenciação do linfócito T helper (TH17). Estão envolvidos na produção de complexos fatores teciduais funcionais.
IL-17/IL-17A	Envolvidas no recrutamento de monócitos e macrófagos para o local da inflamação, também liberado por células natural killer. Pode ter propriedade quimiotática devido à regulação positiva de fator estimulador de colônia de granulócitos e CXC quimiocinas.
Citocinas antiinflamatórias	
TGF- β	Modula a atividade de outras citocinas através do efeito potencializador ou antagonista. Diminui a proliferação e diferenciação de linfócitos T e B.
IL-4	Não é liberada de forma sistêmica durante a sepse na circulação. Suprime a atividade de macrófago e tem efeito imunossupressor
IL-10	Envolvida na modulação da resposta pró-inflamatória, para mover o sistema imune da resposta mediada por célula para resposta imune humoral. Inibe a resposta imune inata. Pode indiretamente bloquear a atividade de citocinas pró-inflamatórias.
IL-13	Afeta a expressão de receptores em macrófagos/monócitos. Reduz a expressão de receptor CD14 e de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 em monócitos.

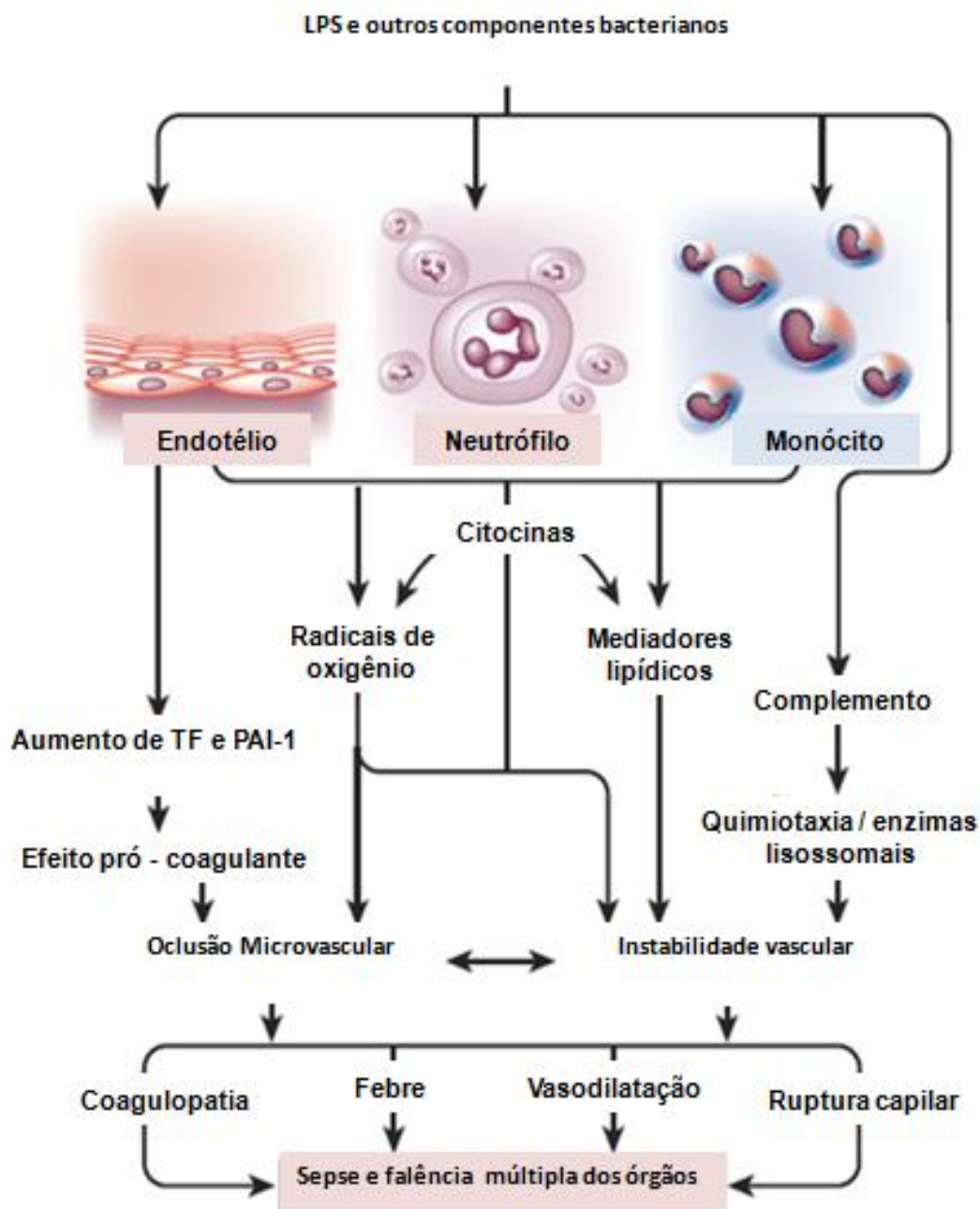
Fonte: Burkovskiy et al., 2013

A evolução da sepse resulta em falência de múltiplos órgãos, coagulação intravascular disseminada, síndrome da angústia respiratória aguda e ocasionalmente morte (Riedmann et al., 2003). Além disso, existem evidências de que a sepse prejudica o funcionamento do sistema imune, interferindo na resposta imune inata e proporcionando apoptose dos linfócitos (Hotchkiss e Karl, 2003).

Durante a ocorrência da falência de múltiplos órgãos, ocorre ativação da resposta imune inata, caracterizada pelos elevados níveis séricos de fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator ativador de plaquetas (PAF), mas também períodos de imunossupressão associados ao estado hipodinâmico (Nguyen et al., 2006).

A falência de múltiplos órgãos é multifatorial. A hipoperfusão e hipóxia são fatores dominantes. O lipopolissacarídeo e outros componentes bacterianos ativam simultaneamente diversos mecanismos contribuindo assim, para a patofisiologia da síndrome da angústia respiratória aguda do adulto (ARDS) e choque séptico. A combinação da contratilidade da muscular lisa brônquica e instabilidade vascular culminarão em hipoperfusão tecidual, oxigenação inadequada e falência múltipla dos órgãos (Cohen, 2002), conforme descrito na figura 07. Durante o processo infeccioso, o número de neutrófilos aumenta próximo às vênulas pós-capilares, eles atravessam a barreira endotelial por diapedese e atingem sítio primário de infecção. Dessa forma, são capazes de ampliar a resposta inflamatória, eliminando os microrganismos pela liberação de agentes bactericidas, tais como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, os neutrófilos liberam citocinas e quimiocinas as quais aumentam o recrutamento e ativação destas e de outras células imunes (Yamashiro et al., 2001). O recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso é extremamente importante para o controle local do crescimento e disseminação de microrganismos (Alves-Filho et al., 2005).

Figura 07: Patogenia do choque séptico.

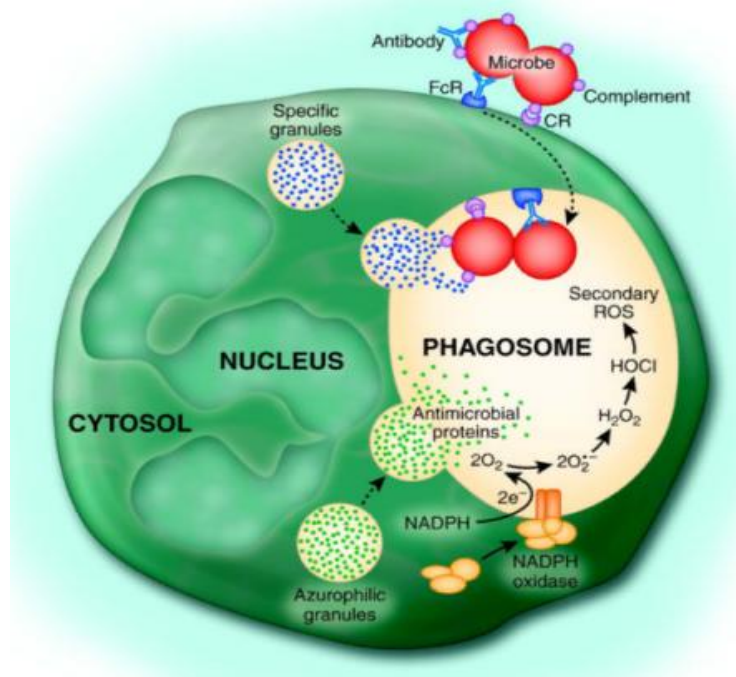


Fonte: Cohen (2002)

A erradicação de microrganismos pelos neutrófilos e macrófagos depende em grande parte da sua capacidade fagocítica (Segal, 2005) e posterior geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o “burst” respiratório. As ERO’s são produzidas no interior do fagossomo por uma série de reações iniciadas pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase, que produz formas

ativas de oxigênio incluindo os radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, fundamentais na eliminação de microrganismos fagocitados – figura 08 (Kobayashi e Deleo, 2009; Miller e Cho, 2011).

Figura 08: Fagocitose e atividade microbicida realizada por neutrófilo.



Fonte: Kobayashi e DeLeo, 2009

O neutrófilo pode eliminar o microrganismo pelo meio intra e extracelular. Após o envolvimento do patógeno no fagossomo, o neutrófilo mata o microrganismo através da liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) dependentes de NADPH e proteínas antibacterianas como a catepsina, defensina, lactoferrina e lisozima no interior do fagossoma e/ou no meio extracelular. Neutrófilos altamente ativados podem eliminar microrganismos extracelulares por liberação de “armadilhas extracelulares” que são proteínas granulares e cromatina que juntos formam as fibras extracelulares que se ligam a patógenos, degradando fatores de virulência eliminando os microrganismos. Armadilhas extracelulares neutrofilicas (NET’s), imobilizam os patógenos, impedindo sua propagação e facilitando a fagocitose (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

O comprometimento da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório é observada na sepse letal induzida por endotoxemia, como por exemplo, pela inoculação de *Staphylococcus aureus* (Crosara-Alberto et al., 2002) e por ligadura e perfuração cecal - CLP letal (Benjamim et al., 2000). Esse fenômeno resulta no aumento do número de bactérias na cavidade peritoneal e no sangue, fato que está associado à elevada taxa de mortalidade. Por outro lado, na sepse sub-letal, a infecção bacteriana é restrita à cavidade peritoneal, a migração neutrofílica não é suprimida e não se observa uma mortalidade significativa (Crosara-Alberto et al., 2002).

Os mecanismos envolvidos na falha da migração neutrofílica não estão completamente compreendidos, mas podem ser decorrentes de uma excessiva liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e um concomitante aumento de NO derivado da NO sintase induzível (iNOS) (Tavares-Murta et al., 1998; 2001). O NO apresenta efeitos vasodilatadores benéficos no sistema microvascular, mas pode estar envolvido na produção de radicais citotóxicos quando em associação com EROS, podendo gerar o ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio iniciando a peroxidação lipídica e potencializando a lesão inflamatória em células vasculares (Beckman et al., 1990; Oeckler e Wolin, 2000).

Os monócitos e macrófagos são populações celulares importantes na resposta imune inata, pois medeiam a inflamação e fagocitose. O macrófago de fenótipo M1 é ativado por sinalização TLR ou IFN- γ para produzir citocinas pró-inflamatórias e desempenhar atividade microbicida. Por outro lado, o fenótipo M2 é ativado na presença de IL-4 e IL-13 em infecções parasitárias e remodelamento tecidual. Durante a sepse as funções do macrófago são limitadas, pois o receptor-1 de morte programada (DP-1R) que é responsável por intensificar a resposta inflamatória também suprime a função do macrófago. Huang et al., 2009 demonstraram que camundongos diminuíram a proliferação bacteriana, com diminuição da mortalidade, quando os macrófagos não expressaram receptor de morte programada – 1 (PD-1), destacando a importância da sinalização supressora na sepse. Da mesma maneira, a adenosina A2A e A2B encontrados nos macrófagos, regulam a resposta imune em macrófagos. Antagonizando o receptor A2B dos macrófagos em modelos de CLP, aumenta a atividade fagocítica com morte bacteriana, reduzindo a inflamação

sistêmica, com resposta pró-inflamatória atenuada e aumento da sobrevivência (King et al., 2014).

Na resposta inflamatória durante a sepse, os macrófagos ou células apresentadoras de antígenos interagem com células T através de sinais aferentes, o antígeno HLA-2. Essa interação resulta no linfócito TCD4⁺ ativado, com uma variedade de respostas que afetam a imunidade inata: 1) a liberação de interferon gama (IFN- γ) para ativar os fagócitos com atividade microbicida; 2) aumento da expressão de CD40L que se liga aos receptor CD40 sobre as células apresentadoras de antígeno, resultando na expressão de moléculas co-estimulatórias; 3) ativação de células natural killer (King et al., 2014).

A população de linfócitos declina no estado séptico, devido a apoptose o que resulta na vulnerabilidade do paciente séptico a infecções nosocomiais. Hotchkiss et al. (2001), investigaram a redução da população de linfócitos no quadro de sepse, em especial, linfócitos TCD4⁺ e B, pois nos modelos de sepse em animais e humanos, os linfócitos dos órgãos linfoides, incluindo baço, timo e medula óssea, sofrem apoptose na fase aguda da sepse.

A fisiopatologia da sepse associada à ARDS (síndrome respiratória aguda) e ALI (injúria pulmonar aguda) é complexa e não é completamente definida. A Sepse associada a ALI é caracterizada pela ativação de várias células, incluindo as células inflamatórias como os polimorfonucleares e macrófagos, além de aumentar o nível de mediadores inflamatórios. O número de neutrófilos no fluido do lavado bronco alveolar de pacientes com ARDS é significativamente maior e está associado com a sobrevivência reduzida. Neutrófilos circulantes se infiltram e acumulam nos pulmões via transmigração através do endotélio, interstício e epitélio alveolar. Quimiocinas e moléculas de adesão promovem contribuem para a diapedese de neutrófilos até o pulmão. No sítio pulmonar as três isozimas NOS estão presentes e várias formas de NO podem ser detectadas tais como S-nitrosotiol, nitrato e nitrito, no ar exalado e no lavado bronco alveolar (Guo e Ward, 2007).

A imunoterapia para controlar os sinais clínicos da sepse deve ser aplicada durante a imunossupressão. Existem protocolos terapêuticos com fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônias de

granulócitos (G-CSF) e IFN - δ que têm sido utilizados na sepse com o objetivo de estimular a resposta imune inata, melhorar a mielopoiese e limitar a apoptose de linfócitos. Em estudos clínicos nos quais a expressão de HLA-DR expresso na superfície de monócitos (mHLA – DR) foi mensurada, a terapia imune-adjuvante leva ao aumento da expressão de mHLA – DR, restaurando a liberação de mediadores como fator de necrose tumoral (TNF α). O fracasso de muitas terapias em quadros de sepse provavelmente está relacionado à falta de estratificação de pacientes com base em seu estado imunológico funcional. O futuro clínico de imunoterapias adjuvantes na sepse deve ser baseado em estratificação dos pacientes usando estado imunitário, biomarcadores que reflitam tanto resposta imune inata como adaptativa, marcadores em potencial como mHLA -DR , contagem de linfócitos T CD4⁺ e IL-10 circulante (Venet et al., 2013).

Referências bibliográficas:

Amaral C.F.S.; Rezende N.A.; Freire M.L. Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *American Journal Cardiology*, v.71, n°2, 242–5, 1993.

Alves-Filho J.C.; Benjamim C.; Tavares-Murta B.M.; Cunha F.Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Memorial Institute Oswaldo Cruz.*, v.100, n° 1, 223-6, 2005.

Bahloul M.; Chaari A.; Dammak H.; Samet M.; Chtara K.; Chelly H.; Ben H. C.; Kallel H.; Bouaziz M. Pulmonary edema following scorpion envenomation: mechanisms, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *International Journal of Cardiology*, v.162, n°2, 86-91, 2013.

Barreiro E.J. ; Bolzani V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova* [online]. 2009, vol.32, n.3, p. 679-688.

Beckman J.S.; Beckman T.W.; Chen J.; Marshall P.A.; Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxyntirite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, v. 87, n°4, 1620–1624, 1990.

Becerril B.; Marangoni S.; Possani L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*, v.35, n°6, 1620-4, 1997.

Benjamim C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Med. Ribeirão Preto*, v. 34, 18-26, 2001.

Borges A.; Silva S.; Op den Camp H.J.; Velasco E.; Alvarez M.; Alfonzo M.J.; Jorquera A.; De Sousa L.; Delgado O. In vitro leishmanicidal activity of *Tityus discrepans* scorpion venom. *In vitro leishmanicidal activity of Tityus discrepans scorpion venom. Parasitology Research*, v. 99, n°2, 167-73, 2006.

Borges C.M.; Silveira M.R., Aparecida M., Beker C.L., Freire-Maia L., Teixeira M.M. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 67, n°4, 515-9, 2000.

Buras J.A.; Holzmann B.; Sitkovsky M. Animal Models of Sepsis: Setting The Stage. *Nature Reviews*, v. 4, n° 10, 854-65, 2005.

Bücherl W. Escorpionismo no Brasil. *Memorial Institute Butantan*, v.34, 9-24, 1969.

Burkovskiy I., Sardinha J., Zhou J.; Lehmann C. Cytokine release in sepsis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v.4, n°9, 860-865, 2013.

Calandra T.; Cohen J. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Critical Care Medicine*, v. 33, n° 7, 1538-48, 2005.

Campos F.V.; Chanda B.; Beirão P.S.; Bezanilla F. β -Scorpion toxin modifies gating transitions in all four voltage sensors of the sodium channel. *The Journal of General Physiology*, v.130, n°3, 257-68, 2007.

Cestèle S.; Catterall W.A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, v. 82, n° 9, 883-892, 2000.

Cestèle S.; Yarov-Yarovoy V.; Qu Y.; Sampieri F.; Scheuer T.; Catterall W.A. Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a β -scorpion toxin. *Journal of Chemical Biology*, v.281, n°30, 21332-44, 2006.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, v. 420, n° 6917, 885-91, 2002.

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*, v. 16, n°8, 920-32, 2009.

Correa M.M.; Sampaio S.V.; Lopes R.A.; Mancuso L.C.; Cunha O.A.B.; Franco J.J.; Giglio J R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-I. *Toxicon*, v.35, n°7, 1997.

Crosara-Alberto D.P.; Darini A.L.; Inoue R.Y.; Silva J.S.; Ferreira S.H.; Cunha F.Q. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Pharmacology*, v. 136, n°5, 645-58, 2002.

Cusinato D.A.C.; Souza A.M.; Vasconcelos F.; Guimarães L.F.; Leite F.P.; Gregório Z.M.; Giglio J.R.; Arantes E.C. Assessment of biochemical and hematological parameters in rats injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.56, n°8, 1477-86, 2010.

De Matos I.M.; Rocha O.A.; Leite R.; Freire-Maia L. Lung oedema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology Toxicology Endocrinology*, v. 118, n°2, 143-8, 1997.

Díaz P.; D'Suze G.; Salazar V.; Sevcik C.; Shannon J.D.; Sherman N.E.; Fox J.W. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*. v. 54, n°6, 802-17, 2009.

Eggimann, P.; Pittet D. Infection control in the ICU. *Chest*, v. 120, n° 6, 2059–2093, 2001.

Fialho E.M.S.; Maciel M.C.; Silva A.C.; Reis A.S.; Assunção A.K.; Fortes T.S.; Silva L.A.; Guerra R.N.; Kwasniewski F.H.; Nascimento F.R. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*, v.58,n°6, 480-5, 2011.

Guo R.F.; Ward P. A. Role of Oxidants in Lung Injury During Sepsis. *Antioxidants e Redox Signaling*, v. 9, n°.11, 1991-2002, 2007.

Hotchkiss R.S.; Tinsley K.W.; Swanson P.E.; Robert E.; Schmieg, Jr.; Hui J. J.; Chang K. C., Osborne D. F.; Freeman B.D.; Cobb J. P.; Buchman T. G.; Karl I. E. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4⁺ T Lymphocytes in Humans. *Journal Immunology* v.166, 6952–6963, 2001

Hotchkiss R. S.; Karl I. E. Medical progress: the pathophysiology and treatment of sepsis. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n° 2, 138-50, 2003.

Huang X.; Venet F.; Wang Y.L.; Lepape A.; Yuan Z.; Chen Y.; Swan R.; Kherouf H.; Monneret G.; Chung C.S.; Ayala A. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, v.106, n°15, 6303-8, 2009.

Instituto Latino Americano de sepse. Campanha sobrevivendo à sepse. Relatório Nacional, 1-14, 2013.

Jawad I.; Lukšić I.; Rafnsson S.B. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. *Journal of Global Health*. v.2, n° 1, 1-9, 2012.

King E.G.; Bauza G.J.; Mella J.R.; Remick D.G. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Laboratory Investigation*, v. 94, n°1, 4–12, 2014.

Kolaczkowska E.; Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews*, v.13, n°3, 159-75, 2013.

Kobayashi S. D.; Deleo, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* , v.1, n°3, 309-33, 2009.

Kenneth D.; Kochanek, M.A.; Betty L.; Smith, B.S. Ed. Deaths: preliminary data for 2002. *National Vital Statistics Reports*, v. 52, n. 13, 2004.

Lvovschi V.; Arnaud L.; Parizot C.; Freund Y.; Juillien G.; Ghillani-Dalbin P.; Bouberima M.; Larsen M.; Riou B.; Gorochov G.; Hausfater P. Cytokine Profiles in Sepsis Have Limited Relevance for Stratifying Patients in the Emergency Department: A Prospective Observational Study. *PLoS ONE*, v.6, n° 12, 1 -13, 2011.

Lira-da-Silva R. M. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones; Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n°3, 2000.

Lourenço W.R.; Leguin E.A. The true identity of Scorpio (Atreus) obscurus Gervais, 1843 (Scorpiones, Buthidae). *Euscorpius - Occasional Publications in Scorpiology*, n°. 75, 1-11, 2008.

Ma H.; Kou, J.; Zhu D.; Yan, Y.; Yu, B. Liu-Shen-Wan, a traditional Chinese medicine, improves survival in sepsis induced by cecal ligation and puncture via reducing TNF- α levels, MDA content and enhancing macrophage phagocytosis. *International Immunopharmacol*, v.6, n° 8, 1355-62, 2006.

McPherson D, Griffiths C, Williams M.; Baker A. Klodawski, Ed; Jacobson B.; Donaldson L. Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. *BMJ Open*, v.3, n°8, 1-7, 2013.

Maciel M.C.G; Farias J.C.; Maluf M.J.; Gomes E.A.; Pereira P.V.S.; Aragão-Filho W.C; Frazão J.B.; Costa G.C; Sousa S.M.; Silva L.A; Amaral F.M.M.; Russo M.; Guerra R.N.M.; Nascimento F.R.F. *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2008.

Martin G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Review of Anti-infective Therapy.*, v. 10, n°. 6, 701-6, 2012.

Miller L.S.; Cho J.S. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nature Review Immunology*, v.11, n°8, 505-18, 2011.

Nascimento K.A.F; Pereira W.S; Melo L.P.; Silva L.A; Reis A.S.; Ribeiro M.N.S; Amaral F.M.M; Nascimento F.R.F. ; . Composições Farmacêuticas à base do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L. e seu uso como agente anti-inflamatório e cicatrizante. Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI1020130001376, 2012.

Yun N.; Lee C.H.; Lee S.M. Protective effect of *Aloe vera* on polymicrobial sepsis in mice . *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n° 6, 1341-1348, 2009.

Nawarak J.; Sinchaikul S.; Wu C.Y.; Liau M.Y.; Phutrakul S.; Chen S.T. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis* v.24, n°16, 2838-54, 2003.

Nguyen H.B.; Rivers E.P.; Abrahamian F.M.; Moran G.J.; Abraham E.; Trzeciak S.; Huang D.T.; Osborn T.; Stevens D.; Talan D.A. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Annals of Emergency Medicine*, v.48, n°1, 28-54, 2006.

Oeckler R.A.; Wolin M.S. New concepts in vascular nitric oxide signaling. *Current Atherosclerosis Reports*, v.2, n°5, 437-44, 2000.

Omar H.; El-Din M. The biological and medical significance of poisonous animals. *Journal of Biology and Earth Sciences*, v.3, n°1, 25-41, 2013.

Peres P.A.C.; Nonaka P.N.; Carvalho P. de T.; Toyama M.H.; Silva C.A.; Vieira R.P.; Dolhnikoff M.; Zamuner S.R.; de Oliveira LV. Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon.*, v. 53, n°7, 779-85, 2009.

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. *International Immunopharmacology*, v.3, n°5, 765-74, 2003.

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

Petricevich V.L.; Hernández C.A; Coronas F.I.; Possani L.D. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon*, v. 50, n°5, 666-75, 2007.

Petricevich, V. L. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*, 1-16, 2010.

Pimenta A.M.C.; Stöcklin R.; Favreau P.; Bougis P.E.; Martin-Eauclaire M.F. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.15, n°17, 1562–1572, 2001.

Pimenta A.M.; De Lima M.E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *Journal of Peptide Science*, v. 11, n°11, 2005.

Van der Poll T.; Opal S.M. Host pathogen interactions in sepsis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 8, n° 1, 32 - 43, 2008.

Riedemann N.C.; Guo R.F.; Ward P.A. The enigma of sepsis. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 112, n.4, 460–467, 2003.

Rittirsch D.; Hoesel L.M.; Ward P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 81, 137–143, 2007.

Reinhart K.; Daniels R.; Machado F.R. O ônus da sepse: uma chamada em apoio ao Dia Mundial da Sepse 2013. *Revista brasileira terapia intensiva [online]*., v. 25, n°.1, 3-5, 2013.

Rios C.E.P.; Maciel M.C.G.; Nascimento F.R.F. Eficácia do tratamento profilático com extrato bruto hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. e da fração hexânica na sepse induzida por ligadura e perfuração cecal. Monografia apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão, 2012.

Santana G.C.; Freire A.C.; Ferreira A.P.; Cháves-Olórtegui C.; Diniz C.R.; Freire-Maia L. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the rat. *Toxicon*, v.34, n°.9, 1063–1066, 1996.

- Schulte W.; Bernhagen J.; Bucala R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets - An Updated View. *Mediators of Inflammation*, 1-17, 2013.
- Segal A.W. How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology*, v. 23, 197–223, 2005.
- Shu Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Product*, v. 61, n° 8, 1053-1071, 1998.
- Simões C.M.O.; Schenkel E.P.; Gosmann G.; Mello J.C.P; Mentz L.A.; Petrovick P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p., 2003.
- Souza Â. T. L.; Maciel M.C.G.; Barroqueiro E.de S. B. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*) em modelo experimental de sepse. Monografia apresentada ao curso de graduação de Nutrição da Universidade Federal do Maranhão, 2011.
- Soleglad M.E.; Fet V. High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). *Euscorpius*, v. 11, n°5, 2003.
- Soares M.R.M.; Azevedo C.S.; Maria M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, v.35, n°4, 359-363, 2002.
- Stocklin R. ; Mebs, D. ; Boulain J.C. ; Panchaud P. A.; Virelizier H.; Gillard-Factor C. Identification of snake species by toxin mass fingerprinting of their venoms. *Methods in Molecular Biology*, v. 146, 317-335, 2000.
- Tavares-Murta B.M. ; Machado J. S.; Ferreira S. H.; Cunha F. Q. Nitric Oxide Mediates the Inhibition of Neutrophil Migration Induced by Systemic Administration of LPS. *Inflammation*, v.25, n°4, 247-253, 2001.
- Tavares-Murta B. M.; Cunha F. Q.; Ferreira S. H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. *British Journal of Pharmacology*, v. 124, n°7, 1369–1374, 1998.
- Theakston R.D.; Kamiguti A.S. A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. *Toxicon*, v.40, n°5, 579-651, 2002.
- Torres-Larios A.; Gurrola G.B.; Zamudio F.Z., Possani L.D. Hadrurin a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n°16, 5023-31, 2000.
- Vasconcelos F.; Lanchote V.L.; Bendhack L.M.; Giglio J.R.; Sampaio S.V.; Arantes E.C. Effects of voltage gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, v.141, p.85-92, 2005.

Venet F; Lukaszewicz A.C.; Payen D.; Hotchkiss R.; Monneret G. Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies *Current Opinion in Immunology*, V.25, 1–7, 2013.

Vincent J.L.; Sakr Y.; Sprung C.L.; Ranieri V.M.; Reinhart K.; Gerlach H.; Moreno R.; Carlet J.; Le Gall J.R.; Payen D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical Care Medicine*, v. 34, n°2, 2006.

Wang H.; Li W.; Li J.; Rendon-Mitchell B.; Ochani M.; Ashok M.; Yang L.; Yang H.; Tracey K. J.; Wang P.; Sama A. E. The Aqueous Extract of a Popular Herbal Nutrient Supplement, *Angelica sinensis*, Protects Mice against Lethal Endotoxemia and Sepsis. *Journal of Nutrition*, v.136, n°2, 360–365, 2006.

Wiersinga W.J.; Leopold S.J.; Cranendonk D.R.; Van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, v.4, n°8, 1–9, 2013.

Wichtermann, K. A.; Baue, A.E.; Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *The Journal of Surgical Research* 29, n°2, 189-201., 1980.

Yamashiro S.; Kamohara H.; Wang J.M.; Yang D.; Gong W.H.; Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *Journal of Leukocyte Biology*, v.69, n° 5, 698-704, 2001.

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

Zuliani, J.P; Freitas, Thalma A.; Conceição, Isaltino M.; Kwasniewski, Fábio H. *Tityus serrulatus* venom increases vascular permeability in selected airway tissues in a mast cell-independent way. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 65, n°3, 229-34, 2013.

4. Resultados

4.1 Capítulo 1 – Artigo intitulado “Recrutamento de células imunológicas induzido pela administração do veneno de *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*”, publicado na Revista de Ciências da Saúde, 2011.

RECRUTAMENTO DE CÉLULAS IMUNOLÓGICAS INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DO VENENO DE *Tityus serrulatus* E *Tityus bahiensis*.¹

FIALHO, Eder M. S.^{2,3}

MACIEL, Márcia C. G.⁴

FARIAS, Jardel C.⁵

REIS, Aramys Silva⁶

ASSUNÇÃO, Anne K. M.⁶

COSTA, Graciomar C.^{3,7}

SILVA, Lucilene A.^{3,8}

GUERRA, Rosane N. M.⁷

KWASNIEWSKI, Fábio H.⁹

NASCIMENTO, Flávia R. F.^{7*}

Resumo: Acidentes envolvendo as espécies *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* têm se tornado um problema de saúde pública na região sudeste, pois o veneno destas espécies causam manifestações clínicas severas, sendo o edema pulmonar a consequência mais grave, podendo levar a vítima ao óbito, principalmente as crianças. Muitas complicações decorrentes do envenenamento estão relacionadas à resposta inflamatória desencadeada pelas toxinas do veneno. O presente estudo avaliou a cinética da migração e ativação celular induzida pelos venenos das duas espécies de escorpião. Camundongos Swiss, 2-3 meses, peso médio 30g, receberam 200µg/Kg, via ip, do veneno de *T. serrulatus* (vTs) e do veneno de *T. bahiensis* (vTb), nos intervalos de 30, 120 e 360 minutos. O grupo controle recebeu apenas o veículo (Solução tamponada com fosfato- PBS). Após os intervalos foram obtidas células do sangue, peritônio, pulmão, linfonodos, medula óssea e feitas as contagens totais usando cristal violeta 0,05% e diferenciais usando coloração do Kit Instant Prov. A análise estatística foi feita usando teste *t*-Student. Os resultados demonstraram que vTs e vTb induzem um aumento significativo do número de células no lavado bronco-alveolar após 30 min e na cavidade peritoneal, após 360 min. Após 30 min os venenos aumentaram o número de células na medula óssea. No linfonodo ocorreu redução no número de células após 30 min e aumento após duas horas. Os dados mostram que os dois venenos interferem no recrutamento celular dos órgãos linfóides em um curto prazo, sugerindo um efeito sobre a modulação da resposta imunológica, o que torna estes bioprodutos candidatos a prospecção de ferramentas biotecnológicas.

Descritores: Veneno; *Tityus*; Escorpião; Inflamação.

Abstract: Immune cells recruitment induced by administration of non-lethal doses of *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* venom. The number of accidents with the scorpion species *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* increased in the last years in Brazil, mainly in the southeast region. The venom from both species induces severe clinical signs. The lung edema is the most serious effect since it can kill the victim in a few minutes, specially, the children. The majority of the clinical complications associated to the envenoming are relate to the inflammatory reaction triggered by the venom toxins. . Based on this proposition, the aim of this study was to evaluate the ability of the venom from *T. serrulatus* and *T. bahiensis* to recruit and activate immune cells from peritoneum and lymphoid organs. Swiss mice, 2-3 months old, 30g, were inoculated with venom from either *T. serrulatus* (vTs) or *T. bahiensis* (vTb) at the non-lethal doses of 200µg/Kg by intraperitoneal route. The control group received only the vehicle constituted by phosphate buffered solution. After 0.5; 2 and 6 hours of envenoming the mice were killed. The peritoneal and broncoalveolar lavage were performed to quantify the inflammatory cells recruitment. The differential cells counts was performed in the peritoneal fluid and peripheral blood using the Instant Prov kit. The cells from the lymph node and bone marrow were counted. The statistical analysis was performed using Student *t* test. The data represent the mean ± SD from 5 animals per group. The results showed that both venoms induced a significant increase on the inflammatory cells recruitment to peritoneum after 6 hours of envenoming. However, the inflammatory cells influx to the lung was already increased after 0.5 hour. The number of bone marrow and lymph node cells, increased and decreased, respectively, after 0.5 hours. After 2 hours, the number lymph node cell increased, but no there was after 6 hours. In summary the data indicate that the scorpion venom has an ability to modulate the recruitment of immunological cells, which is different according to the time and the organ evaluated. The results obtained here point to the perspective of to develop a biotechnological tool useful in the inflammatory immune response induction.

Descriptors: Venom; *Tityus*; Scorpion, Inflammation.

INTRODUÇÃO

¹ Monografia de graduação em Ciências Biológicas – UFMA.

² Mestre em Biodiversidade e Conservação – UFMA.

³ Doutorando (a) em Patologia Experimental – FIOCRUZ/BA.

⁴ Doutoranda em Biotecnologia (RENORBIO) – UFMA.

⁵ Especialista em Imunologia – UFMA.

⁶ Mestrando em Ciências da Saúde – UFMA.

⁷ Professora do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – UFMA.

O escorpionismo é um problema de saúde pública presente principalmente nas regiões tropicais, como Oriente Médio, África, Índia e América Latina⁶. No Brasil, o gênero *Tityus* é o principal responsável pelo escorpionismo. Pertencente à família Buthidae, o gênero é representado no Brasil por 35 espécies, sendo *Tityus stigmurus*, *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* as principais espécies para saúde pública^{16,28}.

O veneno escorpiônico é formado principalmente por neurotoxinas, as quais se ligam a sítios específicos dos canais iônicos presentes na membrana de células excitáveis, aumentando sua permeabilidade e provocando a despolarização da membrana plasmática. As toxinas que se ligam preferencialmente aos canais de Na⁺ são as principais responsáveis pelo efeito tóxico do veneno^{12,13}.

Devido a ação das neurotoxinas, o veneno causa no local da picada sinais como parestesia e dor, além de eritema e edema^{1,8,18,21}, podendo resultar em resposta inflamatória sistêmica com elevação da concentração circulante de citocinas e quimiocinas e, nos casos mais graves, em edema pulmonar, que é a principal causa de óbito entre crianças^{9,15,17,22}. Além disso, na inflamação decorrente do veneno de escorpiões ocorre recrutamento leucocitário, ativação do sistema complemento, do sistema de cininas e aumento na produção de proteínas de fase aguda^{4,7,14}.

Poucos estudos enfatizam a ação do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* na ativação das células do sistema imunológico. Petricevich²⁵ (2002) mostrou que o veneno de *T. serrulatus* apresenta função imunomodulatória sobre macrófagos murinos *in vitro*, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e de TNF, IFN- γ e IL-6. Pessini²³ et al. (2003), envenenando camundongos com o mesmo veneno, por via intraperitoneal, observou aumento de células na cavidade peritoneal, da concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias e das proteínas de fase aguda. Embora existam controvérsias¹⁹, há evidências que mastócitos também podem ser ativados *in vivo* pelo

veneno do *T. serrulatus*¹⁰, o que provocaria uma onda de mediadores inflamatórios (histaminas, mediadores lipídicos e citocinas).

Os venenos são uma promissora fonte de moléculas com atividades farmacológicas, devido a alta especificidade e eficácia dos peptídeos deles derivados, a facilidade de sintetizar ou produzir moléculas recombinantes e a resistência de muitos peptídeos ricos em pontes dissulfetos à degradação proteolítica. Somado a isto, a obtenção de produtos a partir dos recursos naturais é um forte argumento para a conscientização de conservação deste e preservação de áreas naturais.

Portanto, a investigação do veneno escorpiônico pode revelar peptídeos imunomoduladores que ativem e recrutem células imunológicas. Entretanto, pouco se sabe sobre o recrutamento celular, principalmente em relação aos órgãos linfóides. Por isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a resposta inflamatória local e sistêmica provocada pelo veneno do escorpião *T. serrulatus* e *T. bahiensis*, e a celularidade dos órgãos linfóides.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram usados camundongos da linhagem Swiss (n=15/grupo) de 8 a 12 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMA e mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Imunofisiologia em ambiente controlado, com turno alternado de 12 horas de claro e escuro. Tanto água quanto ração foram oferecidas livremente até o dia do sacrifício. Os animais foram manipulados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), protocolo n° 006438/2008-68.

Obtenção do veneno

Foram utilizados os venenos brutos e liofilizados dos escorpiões *Tityus serrulatus* (vTs) e *Tityus bahiensis* (vTb) (Instituto Butantan, Brasil), mantidos à -20°C até o momento do uso, quando foram então diluídos em solução tamponada com fosfato (PBS) estéril.

Tratamento

Os camundongos foram envenenados, via ip, com a dose não letal de 200µg/Kg do veneno bruto dos escorpiões *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*. Após 30, 120 e 360 minutos os animais foram sacrificados (15 animais/intervalo) e comparados ao grupo controle que recebeu apenas PBS estéril. Todos os animais foram sacrificados no mesmo intervalo. O sacrifício foi feito por excesso de anestésico (150mg/kg de Cloridrato de Cetamina e 120mg/Kg de Cloridrato de Xilazina).

Obtenção das células peritoneais

A cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS estéril. As suspensões celulares obtidas por aspiração com seringa e agulha foram transferidas para tubos de polipropileno com fundo cônico e mantidas em banho de gelo (4°C) até a realização da contagem celular total e diferencial.

Para a contagem do número total as células foram fixadas e coradas com uma solução de cristal violeta (0,5% em ácido acético 30%). As células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico de luz comum e aumento de 400 vezes. Para contagem diferencial foi utilizada a citospin e as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina.

Histologia da membrana peritoneal

Um fragmento da membrana peritoneal (1cm²) foi retirado e fixado em formol 10% para análise histológica. Secções de 5 mm foram coradas com hematoxilina e eosina para análise histológica.

Lavado Bronco-Alveolar (LBA)

A cavidade bronco-alveolar foi lavada com 1mL de PBS injetado pela traquéia e aspirado usando seringa e agulha. A suspensão celular foi colocada em banho de gelo até o momento da contagem celular total conforme acima. Após a obtenção do lavado bronco-alveolar o pulmão foi fixado em formol 10% para análise histopatológica.

Obtenção dos órgãos linfóides

Após o sacrifício, o fêmur e o linfonodo foram retirados para a avaliação do peso e celularida-

de. O fêmur foi perfundido com 1mL de PBS para obtenção das células da medula óssea. Em seguida foi feita a contagem celular conforme descrito acima. O baço foi retirado e triturado em 5mL de PBS com auxílio de tamis. A contagem se deu como descrito acima.

Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando o teste *t*-Student. Os dados foram expressos com a média ± desvio padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Efeito inflamatório local

Os dois venenos reduziram o número de células na cavidade peritoneal após 30 minutos. O vTb aumentou o número de células peritoneais ao final de 120 e 360 minutos, enquanto o vTs só aumentou o número de células após 360 minutos (Fig. 1).

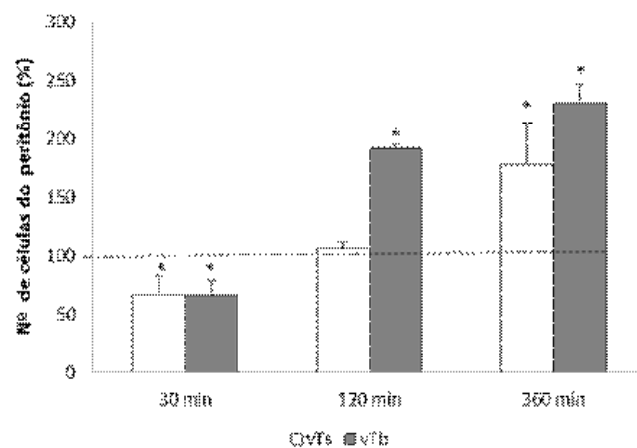


Figura 1 - Efeito do vTs sobre o número total de células da cavidade peritoneal. Camundongos receberam, por via i.p PBS (controle), vTs ou vTb (200ug/Kg) e foram sacrificados após 30, 120 e 360 minutos. Os resultados foram expressos por média±DP dos valores percentuais em relação ao controle (---). * $p < 0,05$ quando comparados aos respectivos controles.

A contagem diferencial das células da cavidade peritoneal revelou que ambos os venenos induziram diminuição aos 30 minutos e aumento aos 360 minutos no número de macrófagos (Fig. 2).

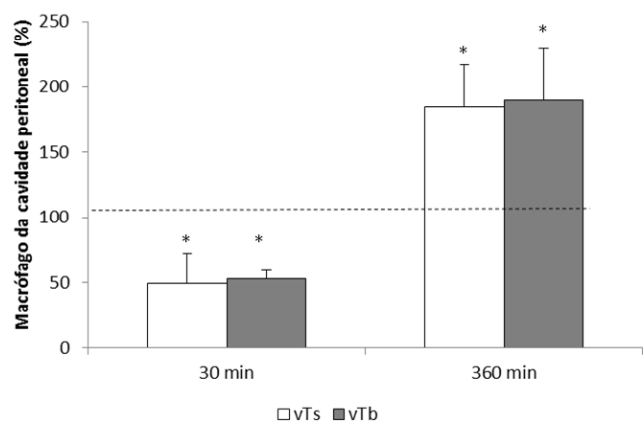


Figura 2 - Efeito do veneno escorpiônico sobre o número de macrófagos da cavidade peritoneal. Camundongos receberam, por via i.p PBS (controle), vTs ou vTb (200ug/Kg) e foram sacrificados após 30, 120 e 360 minutos. Os resultados foram expressos por média±DP dos valores percentuais em relação ao controle (---). * p<0,05 quando comparados aos respectivos controles.

Efeito inflamatório sistêmico

Análise do percentual de neutrófilos no sangue periférico revelou diferenças quanto ao veneno utilizado. Apenas o vTs aumentou o percentual de neutrófilos em relação ao controle após 30 minutos do envenenamento. Ao final de 120 minutos, apenas o vTb aumentou o percentual de neutrófilos. No intervalo de 360 minutos os dois venenos induziram aumento significativo de neutrófilos (Fig. 3).

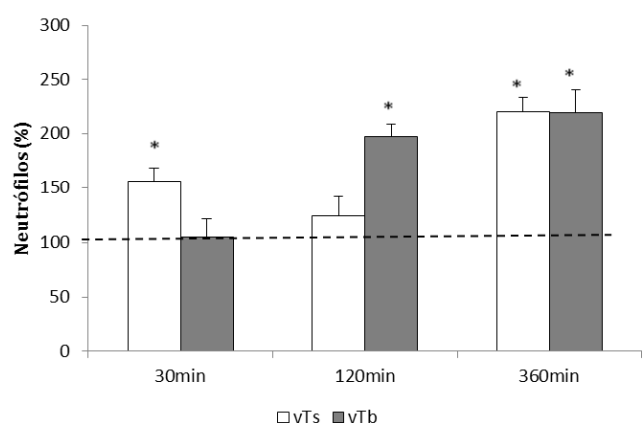


Figura 3 - Efeito do veneno escorpiônico sobre o percentual de neutrófilos no sangue. Camundongos receberam, por via i.p PBS (controle), vTs ou vTb (200ug/Kg) e foram sacrificados após 30, 120 e 360 minutos. Os resultados foram expressos por média±DP. dos valores percentuais em relação ao controle (---). * p<0,05 quando comparados aos respectivos controles.

Resposta inflamatória pulmonar

Mesmo utilizando uma dose não letal, ambos os venenos foram capazes de aumentar o número de células inflamatórias no espaço bronco-alveolar. Entretanto, este efeito só foi significativo 30 minutos após o envenenamento (Fig. 4).

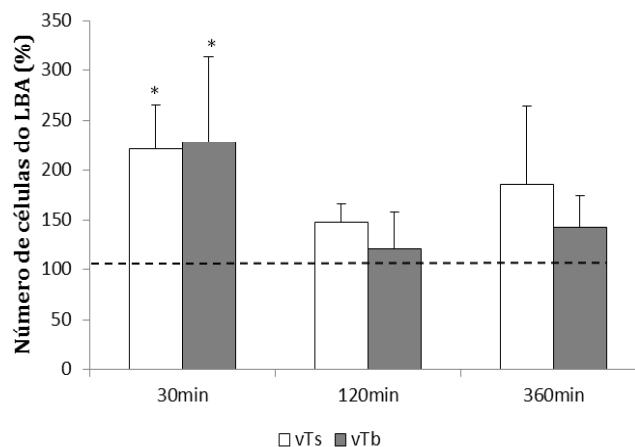


Figura 4 - Efeito do veneno escorpiônico sobre o número total de células do Lavado Bronco-alveolar. Camundongos receberam, por via i.p PBS (controle), vTs ou vTb (200ug/Kg) e foram sacrificados após 30, 120 e 360 minutos. Os resultados foram expressos por média±DP dos valores percentuais em relação ao controle (---). * p<0,05 quando comparados aos respectivos controles.

Análise dos órgãos linfóides

O envenenamento alterou a celularidade tanto dos órgãos linfóides primários, como a medula, como dos secundários, como os linfonodos drenantes (mesentéricos). Neste último, os venenos induziram uma redução do número de células após 30 minutos, a qual foi invertida após 120 minutos. Aos 360 minutos o número de células já era igual ao controle (Fig. 5A).

O vTs induziu aumento do número de células da medula óssea após 30 minutos e 120 minutos, em contrapartida ocorreu uma redução desta população celular após 360 minutos. Por outro lado, o vTb induziu um aumento do número de células após 30 minutos e uma redução notada logo aos 120 e persistente até os 360 minutos (Fig. 5B).

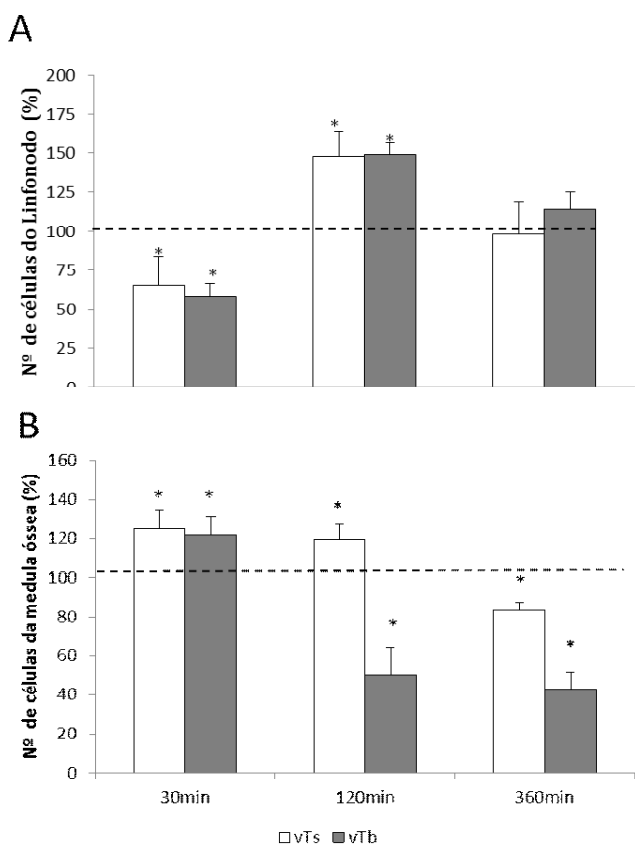


Figura 5 - Efeito do veneno escorpiônico sobre os órgãos linfóides: (A) Linfonodo mesentérico; (B) Medula óssea. Camundongos receberam, por via i.p PBS (controle), vTs ou vTb (200ug/Kg) e foram sacrificados após 30, 120 e 360 minutos. Os resultados foram expressos por média±DP dos valores percentuais em relação ao controle (---). * p<0,05.

DISCUSSÃO

Os venenos testados, quando administrados por via intraperitoneal, induziram alterações locais e sistêmicas no número de células imunológicas. O envenenamento por via ip induziu alterações nas populações peritoneais, em especial, no número de macrófagos.

Zuliani²⁹ et al. (2011) demonstraram que as reações iniciais da resposta inflamatória induzida pelo veneno, não estariam relacionadas aos produtos liberados por mastócitos. Entretanto, De-Matos¹⁰ et al (2001) demonstraram que os mastócitos são importantes na indução do edema pulmonar pelo veneno, uma vez que quando os autores depletaram os mastócitos a inflamação pulmonar foi anulada. De fato, outras substân-

cias bioativas presentes no veneno em baixas concentrações, como a histamina e 5-hidoxitriptamina, podem iniciar a resposta inflamatória, além de envolver os metabólitos da cascata do ácido aracdônico¹⁹.

Para explicar a redução do número total de células na cavidade peritoneal algumas hipóteses poderiam ser levantadas. Uma, seria a aderência das células à membrana peritoneal. A segunda seria a migração de células apresentadoras da cavidade para o linfonodo e a terceira seria a apoptose das células residentes.

O desequilíbrio iônico provocado pelo aumento da permeabilidade aos íons de Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Cl⁻, pode ativar a via das caspases que culmina na entrada da célula em apoptose²⁰. Entretanto, ensaios de citotoxicidade do veneno *in vitro* com diferentes linhagens de células não demonstraram esta propriedade dos venenos (dados não mostrados). Mas não podemos descartar totalmente esta hipótese, visto que no contexto *in vivo* não foi feito nenhum ensaio.

Em relação à primeira hipótese, a membrana peritoneal foi avaliada histologicamente e não foi verificada aderência das células peritoneais à membrana (dados não mostrados). Dessa forma, baseado em nossos resultados, podemos sugerir que houve a saída das células estimuladas pelo veneno para o linfonodo ou para outro espaço como o bronco-alveolar. De fato, o lavado bronco-alveolar apresentou aumento significativo quanto ao número de células aos 30 minutos, sendo que ao mesmo tempo houve redução do número de células no linfonodo. Sugerindo que as células inflamatórias estavam sendo recrutadas para focos distantes daquele do estímulo inicial.

Aos 360 minutos, entretanto, o perfil foi totalmente diferente. Os venenos estudados induziram migração destas células para a cavidade peritoneal. Em estudos *in vitro*, os macrófagos cultivados na presença do veneno produziram IL-6 e IFN- γ , além de espécies reativas como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio²⁵. Esses produtos são importantes mediadores inflamatórios com ampla atividade biológica, principalmente a IL-6, podendo ser responsável tanto

pela resposta de fase aguda, como também pela ativação e migração de células tardias²⁰.

Andrade³ et al (2006) demonstraram que o pulmão é um importante órgão produtor de IL-6, tanto no envenenamento como também em casos de infecções. Possivelmente, o aumento do número de células na cavidade bronco-alveolar pode ter sido estimulado pela produção de citocinas no pulmão, recrutando células tanto da cavidade peritoneal como também do linfonodo, onde o veneno induziu uma redução no mesmo intervalo.

Até o momento, observamos que tanto o vTs, como o vTb, possuem um importante papel no recrutamento de células inflamatórias. Isso se confirma quando verificamos a diminuição do número de células da medula. De fato, outros estudos já evidenciaram o efeito do veneno escorpiônico sobre a hematopoiese, acelerando o desenvolvimento das células, como também o recrutamento de células^{5,11}.

Além do mais, Borges⁵ et al (2000) mostraram a relação, dependente do fator ativador de plaquetas, entre a diminuição do número de células da medula e o aumento do número de neutrófilos no sangue. Nossos resultados corroboram com estes dados, pois também encontramos a mesma relação, o que justifica o aumento de neutrófilos no sangue.

A caracterização da atividade biológica dos venenos brutos é necessária, pois possibilita o direcionamento de novos estudos. O veneno dos escorpiões *T. serrulatus* e *T. bahiensis* demonstraram iniciar uma rápida resposta inflamatória e modular a celularidade dos órgãos linfóides de forma tempo-dependente. Entretanto, o veneno mesmo administrado na dose não letal de 200µg/Kg e pela via ip, ainda foi capaz de causar alteração no número de células pulmonar.

Para o gênero *Tityus*, apenas o veneno do escorpião *T. serrulatus* possui frações com atividades bem caracterizadas. Petricevich²⁴ et al (2007) trataram macrófagos *in vitro* com uma fração do vTs, denominada toxina-γ, ou tityustoxina (TsTx-I), e observaram que os macrófagos estabeleceram um balanço entre a produção de citocinas Th1/Th2, indicando ação imunomoduladora para a fração.

O veneno escorpiônico possui importantes constituintes que agem, principalmente, sobre o recrutamento celular dos órgãos linfóides primários e secundários. Desse modo, nosso estudo mostra o papel dos venenos testados sobre o recrutamento das células imunológicas em decorrência do potencial em fornecer importantes peptídeos com atividades sobre o sistema imunológico.

AGRADECIMENTOS

O estudo teve suporte financeiro da FAPESP (04/14297), PRONEX/CNPq/FAPEMA (no. 1337/2009) e PROCAD/CAPES (no 046/2007). Os autores agradecem ainda à CAPES pela bolsa de mestrado para EMSF e AKM; ao CNPq pela bolsa de IC para JCF, pelas bolsas de mestrado para ASR, TSF, pela bolsa de doutorado para GCC e pelas bolsas de produtividade em pesquisa para RNMG e FRFN; à FAPEMA pela bolsa de doutorado de MCGM.

REFERÊNCIAS

1. Alves RS, Nascimento NRF, Barbosa PSF, Kerntopf MR, Lessa LMA, Sousa CM, Martins RD, Sousa DF, Queiroz MGR. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 2005; 46: 271-276.
2. Amaral CFS, Rezende NA. Both cardiogenic and non-cardiogenic factors are involved in the pathogenesis of pulmonary oedema after scorpion envenoming. *Toxicon* 1997, 35: 997-998.
3. Andrade MV, Lisboa FA, Portugal AL, Arantes RME, Cunha-Melo JR. Scorpion venom increases mRNA expression of lung cytokines. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 146:581-587.
4. Bertazzi DT, Assis-Pandochi AI, Talhaferro VL, Caleiro AE, Pereira LS, Arantes EC. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Int. Immunopharmacol* 2005; 5:1077-1084.

5. Borges CM, Silveira MR, Beker MAC, Freire-Maia L, Teixeira, MM. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. J. Leuk. Biol. 2000; 67:515-519.
6. Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. Acta Trop. 2008; 107: 71-79.
7. Coelho FM, Pessini AC, Coelho AM, Pinho VS, Souza, DG, Arantes EC, Teixeira MM, Teixeira AL. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. Toxicon 2007; 50:420-427.
8. Cupo P, Figueiredo AB, Filho AP, Pintya AO, Tavares GA, Caligaris F, Marin-Neto JA, Hering SE, Simões MV. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. Int. J. Cardiol. 2007; 116:98-106.
9. Cupo P, Jurca M, Azevedo-Marques MM, Oliveira JSM, Iiering SE. Severe scorpion envenomation in Brazil, clinical, laboratory and anatomopathological aspects. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1994; 36:67-76.
10. De-Matos IM, Talvani A, Rocha OO, Freire-Maia L, Teixeira MM. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. Toxicon 2001; 39:863-867.
11. Dong W, Wang L, Kong T, He Y. Scorpion venom peptides accelerate hematopoietic recovery of myelosuppression in irradiated mice. Am J Chin Med. 2009; 37:701-712.
12. Elgar D, Plessis JD, Du Plessis L. Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure-function relationship and mode of action. Afr. J. Biotechnol. 2006; 5:2495-2502.
13. Freire-Maia, L. Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. J. Toxicol. Toxin Rev. 1995; 14:423-435.
14. Fukuhara YDM, Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQ, Reis ML, Donadi, EA. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2004; 196:390-395.
15. Fukuhara YDM, Reis ML, Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQ, Donadi EA. Increased plasma levels of IL1- α , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. Toxicon 2003; 41:49-55.
16. Lira-da-Silva RM, Amorim AM, Brazil TK. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones: Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 33:239-24
17. Magalhães MM, Pereira MES, Amaral CFS, Rezende NA, Campolina D, Bucarechi F, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. Toxicon 1999; 37:1155-1164.
18. Melo JR, Araújo GKM, Luz MMP, Conceição SA, Lisboa FA, Moraes-Santos T, Cunha-Melo, JR. Effect of acid secretion blockade on acute gastric mucosal lesions induced by *Tityus serrulatus* scorpion toxin in anaesthetized rats. Toxicon 2006; 48: 543-549.
19. Nascimento Jr EB, Costa KA, Bertollo CM, Oliveira AC P, Rocha LT, Souza AL, Glória MBA, Moraes-Santos T, Coelho MM. Pharmacological investigation of the nociceptive response and edema induced by venom of the scorpion *Tityus serrulatus* Toxicon 2005; 45: 585 - 593
20. Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. Curr. Opin. Pharmacol. 2004; 4:386-391.

21. Pardal PPO, Castro LC, Jennings E, Pardal JSO, Monteiro, MRCC. Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. RevSocBrasMed Trop. 2003; 36:349-353.
22. Pessini AC, Santos DR, Arantes EC, Souza GE. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. Toxicon 2006; 48:556-566.
23. Pessini AC, Souzam AM, Faccioli LH, Gregório OZM, Arantes EC. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. Int. Immunopharmacol 2003; 3: 765-774.
24. Petricevich VL, Cruz AH, Coronas FI, Possani LD. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. Toxicon 2007; 50:666-675.
25. Petricevich VL. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. Med Inflamm 2002; 11:23-31.
26. Revelo MP, Bambirra EA, Ferreira AP, Diniz CR, Chavez-Olortegui C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. Toxicon 1996; 34:1119-1125,
27. Roselli F, Livrea P, Jirillo E. Voltage-Gated Sodium Channel Blockers as Immunomodulators. Recent Pat CNS Drug Discov 2006, 1:83-91
28. Soares MRM, Azevedo CS, De Maria M. Escorpionismo em Belo Horizonte, MG: um estudo retrospectivo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2002; 35:359-363.
29. Zuliani JP, Freitas TA, Conceição IM, Kwasniewski FH. *Tityus serrulatus* venom increases vascular permeability in selected airway tissues in a mast cell-independent way. Exp Toxicol Pathol 2011; doi:10.1016/j.etp.2011.08.010.

*** Autor para correspondência:**
E-mail: nascimentofrf@yahoo.com.br

4. Resultados

4.2 Capítulo 2 – Artigo intitulado “Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus*”, publicado na *Toxicon*, 2011.



Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom

Eder M.S. Fialho^a, Márcia C.G. Maciel^a, Arley C.B. Silva^a, Aramys S. Reis^a, Anne Karine M. Assunção^a, Thiare S. Fortes^a, Lucilene A. Silva^a, Rosane N.M. Guerra^a, Fabio H. Kwasniewski^b, Flávia R.F. Nascimento^{a,*}

^aImunofisiologia of Laboratory, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

^bUniversity of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2011

Received in revised form 5 August 2011

Accepted 9 August 2011

Available online 27 August 2011

Keywords:

Tityus serrulatus

Venom

Inflammation

Cytokines

Immunomodulatory

ABSTRACT

Despite several studies showed that the *Tityus serrulatus* scorpion venom (Tsv) induces an inflammatory response, just a few have investigated the effect of the venom on the immune response. Therefore, the aim of this study was to evaluate alterations of venom application on lymphoid organs and on the recruitment and activation of cells and also on the cytokine production. Swiss male mice (2–3 months, 20–25 g) received a non-lethal dose of crude Tsv (200 µg/kg), diluted in sterile PBS by subcutaneous route. Control animals received only sterile PBS. The animals were sacrificed after 30, 120 and 360 min. The inflammatory parameters studied were skin histology at the site of venom application, leukocyte count, and blood cytokine levels (IL-6, IL-10, and TNF- α). Inguinal lymph node, spleen and bone marrow cellularity was determined for evaluation of the Tsv effect on immune system organs. The results showed that Tsv caused no local inflammation, but it induced an increase of blood neutrophils and serum IL-6, TNF- α and IL-10. After 360 min of envenomation there was a reduction in the cells number from peritoneum and spleen, but there was an increase in the cell number from lymph nodes. In conclusion, the Tsv induces systemic alterations characterized by changes in the cell number in lymphoid organs, increase pro and anti-inflammatory cytokines.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Scorpion envenomation has become a public health problem in many regions of the world due to the increasing number of accidents and the severity of the condition (Chippaux and Goyffon, 2008). In Brazil, *Tityus* is the main genus responsible for scorpion envenomation. This genus belongs to the family Buthidae and is represented in Brazil by 35 species. *Tityus serrulatus* and *Tityus bahiensis* are the most important species for public health (Bucaretychi et al., 1995).

Scorpion venom mainly consists of neurotoxins that bind to specific sites on ion channels of the membrane cells causing an increase in their permeability (Elgar et al., 2006). Toxins that preferentially bind to Na⁺ channels are the main substances responsible for the toxic effect of the venom. The action of these neurotoxins causes signs of paresthesia and pain at the sting site, as well as erythema and edema (Freire-Maia, 1995; Pardal et al., 2003; Alves et al., 2005; Melo et al., 2006; Cupo et al., 2007). The toxins induce a systemic inflammatory response characterized by pulmonary edema that is the main cause of death among children and also by increased levels of cytokines and chemokines (Cupo et al., 1994; Magalhães et al., 1999; Fukuhara et al., 2003; Pessini et al., 2003). In addition, inflammation in scorpion envenomation involves

* Corresponding author. Campus do Bacanga, Prédio do Integrado, CCBS, Bloco 1, Laboratório de Imunofisiologia, Av. dos Portugueses s/n, Bacanga, CEP 65085-580, São Luís, MA, Brazil. Tel.: +55 98 33018548.

E-mail address: nascimentooff@yahoo.com.br (F.R.F. Nascimento).

the acute-phase proteins, the complement and kinin systems and is also characterized by the leukocyte recruitment (Pessini et al., 2003; Fukuhara et al., 2004; Bertazzi et al., 2005; Coelho et al., 2007).

Few studies have investigated the effect of *T. serrulatus* scorpion venom on the activation of immune cells (Petricevich, 2002; Petricevich and Lebrum, 2005). Petricevich et al. (2007) demonstrated the action of *T. serrulatus* venom fraction on murine macrophages *in vitro*, with the observation of an increase in the production of reactive oxygen species and cytokines such as TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 and IL-10.

The aim of the present study was to characterize the local and systemic inflammatory response induced by subcutaneous administration of *T. serrulatus* scorpion venom. We studied the histological alterations at the site of injection, the production of cytokines participating in the inflammatory response, and neutrophil mobilization to blood. In addition, we investigated the effect of the venom on the cellularity of immune organs (bone marrow, lymph nodes and spleen) and peritoneal cavity and on *ex vivo* cell proliferation. It was found that *T. serrulatus* venom induces a rapid inflammatory response and alters the migration of immune cells and cytokine profile in a time-dependent manner.

2. Material and methods

2.1. Venom

The lyophilized crude *T. serrulatus* scorpion venom (Tsv) was obtained from the Arthropod Laboratory of Instituto Butantan. The venom was stored at -20°C until the time of use, when it was diluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS).

2.2. Animals and envenomation

Swiss male mice (2–3 months, 20–25 g) were obtained from the Central Animal House of Universidade Federal de Maranhão (UFMA) and kept at the animal house of the Laboratory of Immunophysiology in a controlled environment under a 12/12-h light/dark cycle. Water and food were available *ad libitum* until the day of sacrifice. The animals were handled according to the guidelines of the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL) and the study was approved by the Ethics Committee of UFMA (protocol No. 006438/2008-68).

For envenomation, the mice were injected by subcutaneous route with a non-lethal dose of Tsv (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and sacrificed after 30, 120 and 360 min ($n = 5$ per sampling time). The control group received only sterile PBS and the animals were sacrificed after the same periods of time ($n = 5$ per sampling time). The animals were sacrificed with an overdose of the anesthetic (150 mg/kg ketamine hydrochloride and 120 mg/kg xylazine hydrochloride).

2.3. Skin histology at the site of Tsv application

After sacrifice, a trichotomy was performed on the back of the animal at the site of venom application. Next, a skin

fragment was removed and fixed in 10% formalin for subsequent histological analysis. The following parameters were evaluated in a random and blind mode: edema formation, vascular congestion, hemorrhage, and cellular infiltration. The results were scored as 0 = absent, 1 = weak, 2 = moderate, and 3 = strong.

2.4. Differential count of blood cells

Blood smears were prepared from the animals and stained with the Instant-Prov kit (Newprov, Pinhais, Brazil). The slides were examined under a common light microscopy at 1000 \times magnification. The percentage of cell subpopulations was calculated based on the count of 100 cells.

2.5. Quantification of serum cytokines

Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- α were quantified by sandwich ELISA using commercial kits (eBioscience, San Diego, CA, USA). Flat-bottom plates (Costar[®], Minnesota, USA) were previously sensitized with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ capture antibody specific for each cytokine. For this purpose, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of the monoclonal capture antibody (1:250) was added and the plates were incubated overnight at 4°C . After incubation, the plates were washed 5 times with PBS-0.05% Tween 20 and nonspecific reactions were blocked by the addition of diluent (200 $\mu\text{L}/\text{well}$) at room temperature for 1 h. After washing the plates 5 times, 100 μL of the standard sample provided by the manufacturer or of the test sample was added to each well and the plates were incubated overnight at 4°C . Next, the plates were washed 5 times with PBS-0.05% Tween 20 and 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of the specific biotin-conjugated detection antibody was added at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After incubation for 1 h at room temperature, the plates were washed 5 times with PBS-0.05% Tween 20 to remove unbound components. Next, 100 μL peroxidase-conjugated avidin (1:250) was added and the plates were incubated for 30 min at room temperature. After 7 washes with PBS-0.05% Tween 20, the colorimetric reaction was developed by the addition of 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of the substrate solution containing 0.5 mg/mL tetramethylbenzidine. After 15 min, the reaction was stopped by the addition of 50 μL 2 N sulfuric acid (H_2SO_4) to each well. The absorbance of each sample was read in an ELISA plate reader at 450 nm. Optical density values were converted into pg/mL using a polynomial equation generated from the standard curve that was constructed with different concentrations of recombinant cytokines.

2.6. Isolation of peritoneal cells

The peritoneal cavity of the animals was washed with 5 mL sterile PBS. Cell suspensions were aspirated with a syringe and needle and transferred to conical propylene tubes. The tubes were kept on ice (4°C) until the time for total and differential cell count. For total cell count, 90 μL of the cell suspensions obtained was removed, fixed, and stained with 10 μL of a solution containing 0.5% crystal violet diluted in 30% acetic acid. The cells were counted in a Neubauer chamber of a light microscope at 400 \times

magnification. For differential cell count, the slides were prepared using the cytopspin system (800 rpm/3 min), fixed, and stained with the Instant-Prov kit (Newprov, Pinhais, Brazil).

2.7. Isolation of lymphoid organs

After sacrifice, the femur, spleen and inguinal lymph node were removed for the evaluation of cellularity. The femur was perfused with 1 mL PBS for the isolation of bone marrow cells. The spleen was removed, triturated with 5 mL PBS and passed through a silk sieve. The inguinal lymph node was removed and triturated with 1 mL RPMI medium supplemented with L-glutamine and 10% fetal bovine serum under a laminar flow chamber for *ex vivo* assays. Total cell counts of the lymphoid organs were performed as described above.

2.8. Statistical analysis

The results are reported as the mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed using the *t* test and differences were considered to be significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Histological alterations in the skin at the site of injection

Histopathological analysis of the skin at the site of Tsv injection showed no significant alterations when compared to the control group at any of the time points studied. The edema formation, vascular congestion and hemorrhage were weak at all time points in both groups. The cellular infiltration was moderate only at 360 min in both groups.

3.2. Neutrophil mobilization to blood

The differential blood count showed that envenomation induced an increase in neutrophil percentage after 120 (13%) and 360 min (32%) when compared to the control group (Fig. 1).

3.3. Cytokine production

The Tsv induced an increase in the seric levels of TNF- α after 30 min and of IL-6 after 120 min when compared to the control group. There was no alteration on IL-10 levels after 30 or 120 min, but Tsv increased the production of IL-10 after 360 min when compared to the control group (Fig. 2).

3.4. Cellularity of the peritoneal cavity and lymphoid organs after envenomation

The Tsv induced a reduction in the total number of cells in all time points, especially in the number of macrophages. No significant differences were observed for the other cell populations (Table 1).

The Tsv did not alter the total number of bone marrow cells (Fig. 3A). However, the number of inguinal lymph

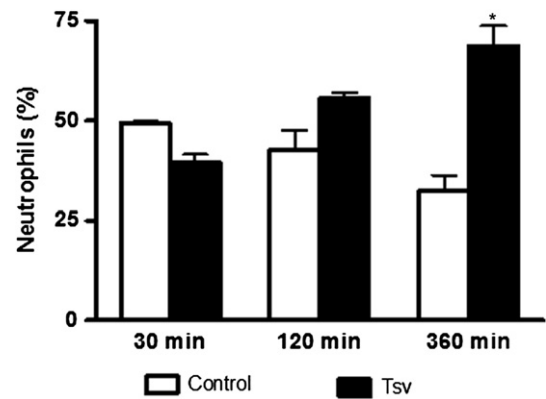


Fig. 1. Effect of Tsv on the blood neutrophils percental. Groups of mice ($n = 5$ per sampling time) received by s.c. route PBS (control) or Tsv (200 μ g/Kg) and each group was killed after 30, 120 and 360 min. The results were expressed by mean \pm SD. * $p < 0.05$ when compared to the respective control group.

node cells was reduced after 30 min and increased after 360 min when compared to the control group (Fig. 3B). The number of spleen cells was reduced only after 120 min of envenomation when compared to control (Fig. 3C).

4. Discussion

We showed here that *T. serrulatus* venom administered subcutaneously did not cause local alterations since there was neither edema formation nor significant cellular infiltration at the site of envenomation. Our results seem to contrast with that found by some authors showing that victims of scorpion envenomation generally present paresthesia, erythema and edema at the sting site (Lira-da-Silva et al., 2000; Horta et al., 2007). In the same way, it was shown that the inoculation of Tsv at the peritoneal cavity or at the paw induced an intense inflammatory infiltrate (Pessini et al., 2003; Severino et al., 2009). These results demonstrate that the presence of a local infiltrate indeed depends on the route of administration. The cell recruitment described by these authors might be related to the action of Tsv on the ion channels of nerve cells (Diniz et al., 1974) which are able to release neuropeptides that act on immune cells causing an inflammatory response (Kalil-Gaspar, 2003). These results suggest that the subcutaneous route which has low innervations, that minimize the effect of neurotoxins on nerve cells, seems to be the most efficient to induce immune response without local tissue damage. This condition permits to suggest the prospection of scorpion venom as a useful biotechnological tool to improve the immune responses.

Despite the Tsv had no local effect when administered by subcutaneous route there was a systemic effect on immune cells. At first, there was an increase in the number of neutrophils in blood, which can be induced by the massive release of neurotransmitters, mainly catecholamines (Vasconcelos et al., 2005) that are associated with an increase in blood pressure (Amaral and Rezende, 1997) and the mobilization of neutrophils (Dávila et al., 2002).

In fact, *T. serrulatus* venom has been shown to induce an increase in blood neutrophils accompanied by the

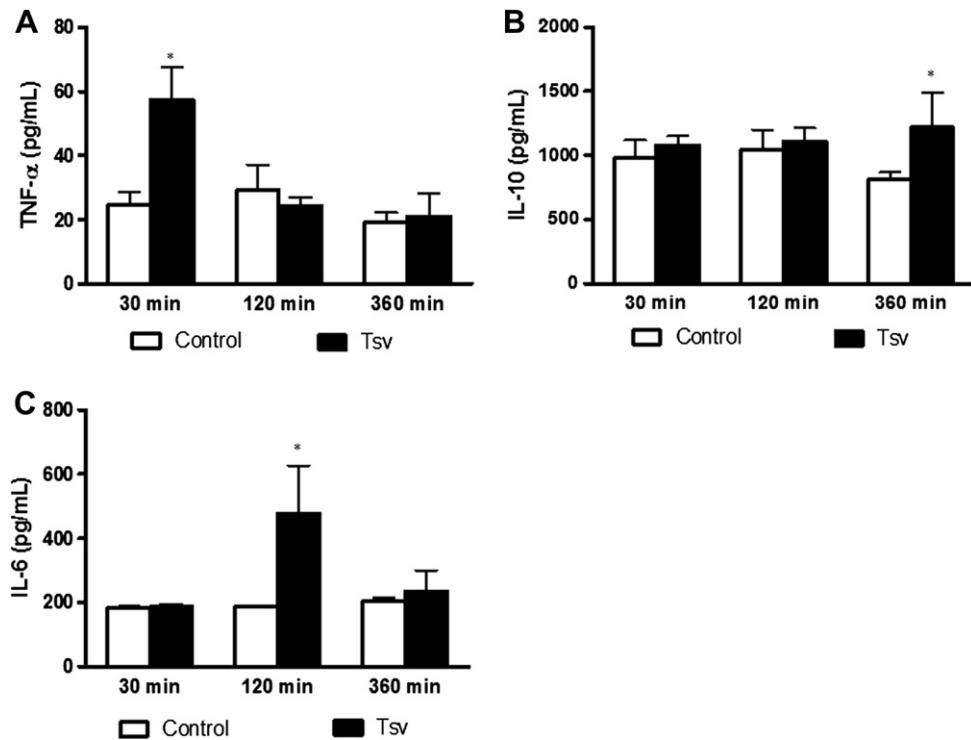


Fig. 2. Effect of Tsv on the seric levels of the cytokines TNF- α (A), IL-10 (B) e IL-6 (C). Groups of mice ($n = 5$ per sampling time) received by s.c. route PBS (control) or Tsv (200 μ g/Kg) and each group was killed after 30, 120 and 360 min. The results were expressed by mean \pm SD. * $p < 0.05$ when compared to the respective control group.

simultaneous reduction in the number of mature neutrophils in bone marrow (Borges et al., 2000). However, in the present study the total number of bone marrow cells did not differ from control. Other studies have reported the capacity of scorpion venom to induce a hematopoietic action, stimulating the maturation of new cells (Dong et al., 2009). This fact might explain the lack of change in the total number of bone marrow cells observed in the present study.

Despite the Tsv had no effect on bone marrow, it induced a reduction at cell number in the lymph node at 30 min after envenomation. However, no difference in the number of lymph node cells was observed after 120 min when compared to control, a finding suggesting repopulation of the organ. The reduction in spleen cells observed

after 120 min might be due to the recruitment of these cells to the lymph nodes. On the other hand, the number of immune cells in the peritoneal cavity, especially macrophages, was also reduced at all time points observed.

In addition to an increase of blood neutrophils and the alterations in the lymphoid organs and peritoneal cavity cellularity, the Tsv also increased the levels of inflammatory cytokines in blood. Other studies had demonstrated the capacity of the venom to induce the cytokines release both *in vivo* (Pessini et al., 2006) and *in vitro* (Petricevich et al., 2007). We showed that the kinetics of cytokines production was very interesting since there was an increase in TNF- α levels at 30 min, in IL-6 levels at 120 min and in IL-10 levels at 360 min. The cytokine kinetics observed here seems to show that the Tsv induces an immediate but auto-

Table 1
Effect of Tsv on peritoneal cells.

	30 min		120 min		360 min	
	Control	Tsv	Control	Tsv	Control	Tsv
Total	1.49 \pm 0.01 ^a	1.13 \pm 0.10*	1.25 \pm 0.24	1.04 \pm 0.04*	1.48 \pm 0.11	0.94 \pm 0.10*
Macrophage	1.40 \pm 0.01	1.00 \pm 0.08*	1.18 \pm 0.21	0.92 \pm 0.05*	1.37 \pm 0.17	0.87 \pm 0.24*
Neutrophils	0.03 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.08 \pm 0.05	0.04 \pm 0.17	0.05 \pm 0.24
Lymphocytes	0.03 \pm 0.02	0.00 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0.03 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Mast Cells	0.03 \pm 0.02	0.00 \pm 0.01	0.09 \pm 0.07	0.06 \pm 0.04	0.08 \pm 0.10	0.03 \pm 0.03

* $p < 0.05$ when compared to the respective control group.

^a mean \pm ($\times 10^6$ cells/mL).

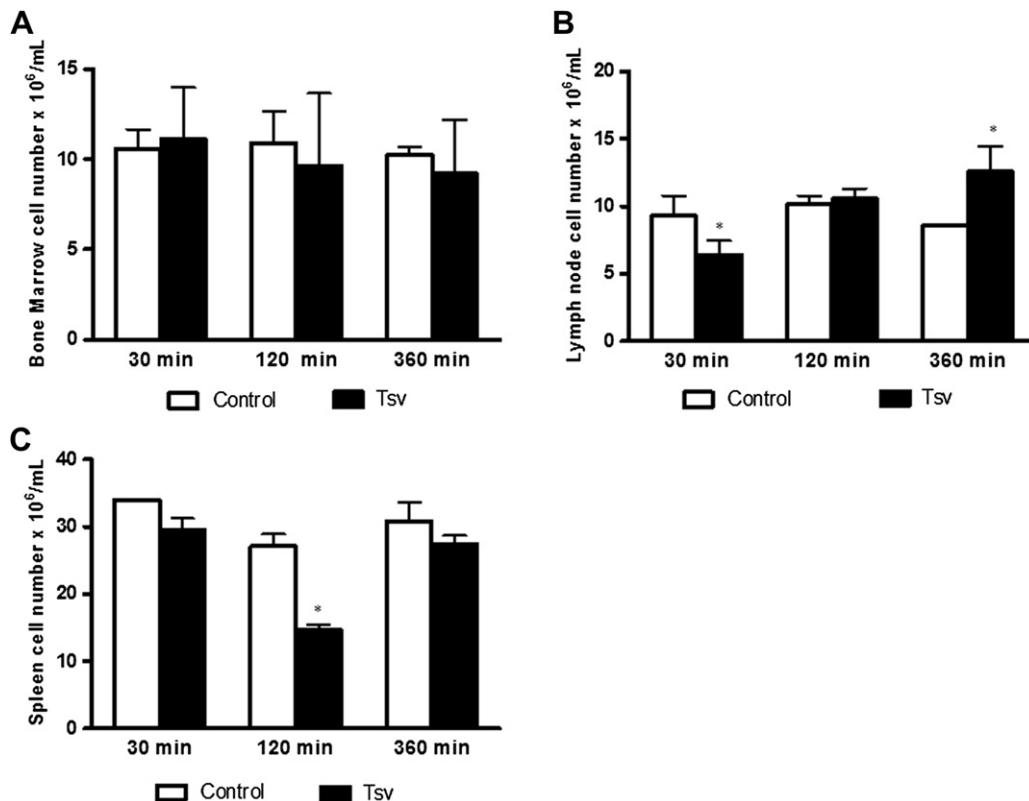


Fig. 3. Effect of Tsv on the lymphoid organs cellularity. (A) Bone Marrow; (B) Lymph node; (C) Spleen. Groups of mice ($n = 5$ per sampling time) received by s.c. route PBS (control) or Tsv (200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) and each group was killed after 30, 120 and 360 min. The results were expressed by mean \pm SD. * $p < 0.05$ when compared to the respective control group.

resolute inflammatory response. Considering that the TNF- α , which was high after 30 min of envenomation, is the main cytokine involved in the acute inflammatory response (Granger and Remick, 2005), as well as, in firstly inflammatory cells activation and recruitment (Crisafulli et al., 2009). Concomitantly, the increase of IL-6 after 120 min suggest an initiation of the resolution of inflammation and of adaptative immune response activation since this cytokine is involved in the mobilization of neutrophil from bone marrow to the blood (Ulich et al., 1989; Suwa et al., 2000), but also, exhibits different biological activities such as lesion repair, regulation of the immune response and B cells differentiation and activation (Nishimoto and Kishimoto, 2004). Finally, the increase of IL-10 after 360 min confirms these hypothesis since it is known as an anti-inflammatory and immune regulator cytokine (Vieira and O'Garra, 2007).

However, the mechanism involved in the activation of immune cells by Tsv, mainly constituted by neurotoxins, remains unclear. One possible mechanism is the binding of neuropeptides, especially substance P, released by nerve cells after depolarization induced by the neurotoxins of the venom to NK receptors present on inflammatory cells (Kalil-Gaspar, 2003). Another plausible mechanism is the direct action of scorpion toxins on the ion channels of immune cells. It is well known that ion channels play an

important modulatory role in the activation of macrophages and lymphocytes, participating in the release of cytokines, proliferation, mitogenesis, elimination of target cells, adhesion, chemotaxis, and activation of inflammatory transcription factors (Cahalan and Chandy, 1997; Cahalan et al., 2001).

Characterization of the biological activity of crude venoms is necessary since it permits the development of new studies. Scorpion venom contains important components that mainly act on the recruitment of cells from primary and secondary lymphoid organs. The present study shows that Tsv is a potential source of important peptides with immunostimulatory activities, emphasizing its role in the recruitment and activation of macrophages, lymphocytes and neutrophils.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES by Master fellowship to EMSF, AKM and to CNPq by Master fellowship to ASR, TSF and to Researcher fellowship to FRFN and RNMG. The authors ACBS and MCGM are grateful to FAPEMA by fellowship and Doctor fellowship, respectively. The work was supported by FAPESP (05/00846-0), PRONEX/CNPq/FAPEMA (no. 1337/2009) and PROCAD/CAPES (no 046/2007).

Conflict of interest statement

None declared.

References

- Alves, R.S., Nascimento, N.R.F., Barbosa, P.S.F., Kerntopf, M.R., Lessa, L.M.A., Sousa, C.M., Martins, R.D., Sousa, D.F., Queiroz, M.G.R., 2005. Renal effects and vascular reactivity induced by *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 46, 271–276.
- Amaral, C.F.S., Rezende, N.A., 1997. Both cardiogenic and non-cardiogenic factors are involved in the pathogenesis of pulmonary oedema after scorpion envenoming. *Toxicon* 35, 997–998.
- Bertazzi, D.T., Assis-Pandochi, A.L., Talhaferro, V.L., Caleiro, A.E., Pereira, L.S., Arantes, E.C., 2005. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1077–1084.
- Borges, C.M., Silveira, M.R., Beker, M.A.C., Freire-Maia, L., Teixeira, M.M., 2000. Scorpion venom-induced neutrophilia is inhibited by a PAF receptor antagonist in the rat. *J. Leuk. Biol.* 67, 515–519.
- Bucaretychi, F., Baracat, E.C., Nogueira, R.J., Chaves, A., Zambrone, F.A., Fonseca, F.S., 1995. A comparative study of severe scorpion envenomation in children caused by *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37, 331–336.
- Cahalan, M.D., Chandy, K.G., 1997. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 749–756.
- Cahalan, M.D., Wulff, H., Chandy, K.G., 2001. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* 21, 235–252.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M., 2008. Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop.* 107, 71–79.
- Coelho, F.M., Pessini, A.C., Coelho, A.M., Pinho, V.S., Souza, D.G., Arantes, E.C., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2007. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom. *Toxicon* 50, 420–427.
- Crisafulli, C., Galuppo, M., Cuzzocrea, S., 2009. Effects of genetic and pharmacological inhibition of TNF- α in the regulation of inflammation in macrophages. *Pharmacol. Res.* 60, 332–340.
- Cupo, P., Jurca, M., Azevedo-Marques, M.M., Oliveira, J.S.M., Iiering, S.E., 1994. Severe scorpion envenomation in Brazil, clinical, laboratory and anatomopathological aspects. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 36, 67–76.
- Cupo, P., Figueiredo, A.B., Filho, A.P., Pintya, A.O., Tavares, G.A., Caligaris, F., Marin-Neto, J.A., Hering, S.E., Simões, M.V., 2007. Acute left ventricular dysfunction of severe scorpion envenomation is related to myocardial perfusion disturbance. *Int. J. Cardiol.* 116, 98–106.
- Dávila, C., Dávila, D., Donis, J., Bellabarba, G., Villarreal, V., Barboza, J., 2002. Sympathetic nervous system activation, antivenin administration and cardiovascular manifestations of scorpion envenomation. *Toxicon* 40, 1339–1346.
- Diniz, C., Pimenta, A., Netto, J., Pompoulos, S., Gómez, M., Bohm, G., 1974. Effect of scorpion venom from *Tityus serrulatus* (Tityustoxin) on the acetylcholine release and fine structure of the nerve terminals. *Experientia* 30, 1304–1305.
- Dong, W., Wang, L., Kong, T., He, Y., 2009. Scorpion venom peptides accelerate hematopoietic recovery of myelosuppression in irradiated mice. *Am. J. Chin. Med.* 37, 701–712.
- Elgar, D., Plessis, J.D., Du Plessis, L., 2006. Cysteine-free peptides in scorpion venom: geographical distribution, structure–function relationship and mode of action. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 2495–2502.
- Freire-Maia, L., 1995. Peripheral effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 14, 423–435.
- Fukuhara, Y.D.M., Reis, M.L., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F.Q., Donadi, E.A., 2003. Increased plasma levels of IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 49–55.
- Fukuhara, Y.D.M., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F.Q., Reis, M.L., Donadi, E.A., 2004. The kinin system in the envenomation caused by the *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 390–395.
- Granger, J., Remick, D., 2005. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock* 24, 45–51.
- Horta, F.M.B., Caldeira, A.P.S., Sares, J.A.S., 2007. Escorpionismo em crianças e adolescentes: aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes hospitalizados. *Rev. Soc. Bras Med. Trop.* 40, 351–353.
- Kalil-Gaspar, P., 2003. Neuropeptídeos na pele. *Bras Dermatol.* 78, 483–498.
- Lira-da-Silva, R.M., Amorim, A.M., Brazil, T.K., 2000. Envenenamento por *Tityus stigmurus* (Scorpiones: Buthidae) no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Soc. Bras Med. Trop.* 33, 239–324.
- Magalhães, M.M., Pereira, M.E.S., Amaral, C.F.S., Rezende, N.A., Campolina, D., Bucaretychi, F., Gazzinelli, R.T., Cunha-Melo, J.R., 1999. Serum levels of cytokines in patients envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 37, 1155–1164.
- Melo, J.R., Araújo, G.K.M., Luz, M.M.P., Conceição, S.A., Lisboa, F.A., Moraes-Santos, T., Cunha-Melo, J.R., 2006. Effect of acid secretion blockade on acute gastric mucosal lesions induced by *Tityus serrulatus* scorpion toxin in anaesthetized rats. *Toxicon* 48, 543–549.
- Nishimoto, N., Kishimoto, T., 2004. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 386–391.
- Pardal, P.P.O., Castro, L.C., Jennings, E., Pardal, J.S.O., Monteiro, M.R.C.C., 2003. Aspectos epidemiológicos e clínicos do escorpionismo na região de Santarém, Estado do Pará, Brasil. *Rev. Soc. Bras Med. Trop.* 36, 349–353.
- Pessini, A.C., Souzam, A.M., Faccioli, L.H., Gregório, O.Z.M., Arantes, E.C., 2003. Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int. Immunopharmacol.* 3, 765–774.
- Pessini, A.C., Santos, D.R., Arantes, E.C., Souza, G.E., 2006. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon* 48, 556–566.
- Petricevich, V.L., 2002. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and the activity of murine macrophages. *Med. Inflamm.* 11, 23–31.
- Petricevich, V.L., Lebrum, I., 2005. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophages functions *in vitro*. *Mediators Inflamm.* 1, 39–49.
- Petricevich, V.L., Cruz, A.H., Coronas, F.I., Possani, L.D., 2007. Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages. *Toxicon* 50, 666–675.
- Severino, D.N., Pereira, R.L., Knysak, I., Cândido, D.M., Kwasniewski, F.H., 2009. Edematogenic activity of scorpion venoms from the buthidae family and the role of platelet-activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms. *Inflammation* 32, 57–64.
- Suwa, T., Hogg, J.C., English, D., Van Eeden, S.F., 2000. Interleukin 6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, H2954–H2960.
- Ulich, T.R., Castillo, J., Guo, K.Z., 1989. *In vivo* hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. *Blood* 73, 108–110.
- Vasconcelos, F., Lanchote, V.L., Bendhack, L.M., Giglio, J.R., Sampaio, S.V., Arantes, E.C., 2005. Effects of voltage-gated Na⁺ channel toxins from *Tityus serrulatus* venom on rat arterial blood pressure and plasma catecholamines. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 141, 85–92.
- Vieira, P., O'Garra, A., 2007. Regula'ten' the gut. *Nat. Immunol.* 8, 905–907.

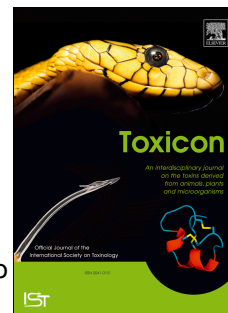
4. Resultados

4.3. Capítulo 3 – “*Tityus serrulatus* scorpion venom treatment improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice”. Artigo publicado na Toxicon, 2014.

Accepted Manuscript

Tityus serrulatus scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice

Marcia C.G. Maciel, Eder M.S. Fialho, Rosane N.M. Guerra, Valéria M. Borges, Fábio H. Kwasniewski, Flavia R.F. Nascimento



PII: S0041-0101(14)00180-9

DOI: [10.1016/j.toxicon.2014.06.018](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.018)

Reference: TOXCON 4865

To appear in: *Toxicon*

Received Date: 6 March 2014

Revised Date: 11 June 2014

Accepted Date: 19 June 2014

Please cite this article as: Maciel, M.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 lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice, *Toxicon* (2014), doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.018.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1 ***Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in**
2 **lethal sepsis induced by CLP in mice**

3 Márcia C. G. Maciel^a, Eder M. S. Fialho^a, Rosane N. M. Guerra^a, Valéria M. Borges^b,
4 Fábio H. Kwasniewski^c, Flávia R. F. Nascimento^{a*}.

5

6 ^aLaboratório de Imunofisiologia. Departamento de Patologia, Centro de Ciências
7 Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

8 ^bFIOCRUZ, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, BA, Brasil.

9 ^cLaboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de
10 Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

11

12 ***Corresponding author:** Flávia R.F. Nascimento

13 Address:

14 Campus do Bacanga, Prédio do Integrado, CCBS, Bloco 1,

15 Laboratório de Imunofisiologia.

16 Av dos Portugueses s/n, Bacanga, São Luís, MA, Brazil

17 CEP 65085-580

18 Phone: 55 98 32728548

19 E-mail: nascimentoofrf@yahoo.com.br

20

21 Abstract

22 *Tityus serrulatus* venom (Tsv) modifies the behavior of immune cells and induces the
23 production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines; such action may interfere
24 with physiological or pathological states. Because sepsis is characterized as an
25 inflammatory disorder, the aim of present study was to investigate the effect of a non-
26 lethal dose of Tsv in mice submitted to a polymicrobial infection by cecal ligation and
27 puncture (CLP) model. The parameters evaluated were survival index, cellularity on
28 lymphoid organs, peritoneal cavity and brochoalveolar space, production of IL-10, IL-
29 12, IL-6, TNF- α , IFN- γ and MCP-1, pulmonary inflammation and oxidative burst. The
30 results demonstrated that in sharp contrast to CLP group in which sepsis was lethal in a
31 24 h period all mice pretreated with Tsv survived even 60 h after CLP. Lung
32 inflammation, another hallmark of CLP group, was also dramatically down regulated in
33 Tsv/CLP group. Despite pretreatment with Tsv did not reduce the inflammatory serum
34 cytokines when compared to CLP group; there was an increase in IL-10. In conclusion,
35 subcutaneous Tsv administration 6 h before CLP was able to control the harmful effects
36 of sepsis (lethality and lung inflammation). We suggest that both systemic IL-10 and
37 oxidative burst are involved in this effect.

38 Key words: *Tityus serrulatus*, venom, CLP, sepsis, inflammation, cytokines

39

40

41 1. Introduction

42 Sepsis is a complex clinical syndrome that results from the host response to an
43 infectious process, which leads to an exacerbated inflammatory response. The condition
44 can progress to disseminated intravascular coagulation, acute respiratory distress
45 syndrome, multiple organ failure, and death. Severe sepsis and septic shock represent
46 major causes of morbidity and mortality and affect more than 750,000 people per year
47 in the United States of America, with an annual mortality of approximately 220,000
48 (Angus et al., 2001). In Brazil, sepsis was suggested as a major public health problem in
49 intensive care units, with an incidence density of approximately 57 per 1,000 patient-
50 days and with mortality rates as high as 50% (Silva et al., 2004). Although sepsis is a
51 well-studied condition in different animal models, it remains very difficult to manage
52 and treat in humans, opening the possibility of studying alternative ways to improve the
53 host response to sepsis or treatment.

54 Some natural products exert a positive impact on the survival index of mice
55 subjected to a cecal ligation and puncture (CLP) model of polymicrobial sepsis (Wang
56 et al. 2006; Maciel et al., 2008; Yang et al., 2009). Previous studies revealed the
57 important effects of some venoms on experimental sepsis (Frolkis et al., 2010). In
58 addition, venom from *Tityus* spp. scorpions increases the number of neutrophils in the
59 blood (Fialho et al., 2011) as well as activates these cells (Borges et al., 2011). Because
60 neutrophils play an important role in the clearance of bacterial infection, it is reasonable
61 to propose that the venom from *Tityus* scorpions may improve the organic dysfunction
62 that occurs during sepsis.

63 *Tityus serrulatus* venom (Tsv) can cause local and systemic inflammation and
64 the generation of soluble mediators with a vast array of effects (Pessini et al., 2003;
65 Severino et al., 2009). Despite deleterious effects, Tsv has immune modulatory

66 properties that could be useful for pathological states in which the modulation of the
67 immune system is an important goal. Studies of the effects of Tsv or its toxins on the
68 immune system have demonstrated that this venom increases the *in vitro* production of
69 reactive oxygen species and cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α),
70 interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-6 (IL-6), by murine macrophages (Petricevich,
71 2002; Zoccal et al., 2011). Systemic IL-6, IL-1 α and TNF- α were also detected in
72 patients who experienced moderate to severe accidents up to 24h later (Fukuhara et al.,
73 2003). In fact, some of the consequences of human and experimental envenomation are
74 associated with the secretion of soluble mediators by immune cells (Petricevich, 2010).

75 In view of the immune-modulatory effects of Tsv and the success achieved in
76 previous studies, we assessed the effect of Tsv on sepsis induced by CLP. The CLP
77 model was chosen because after the perforation of the intestinal wall, a subsequent and
78 gradual release of fecal material into the peritoneal cavity induces peritonitis, which can
79 progress to sepsis and septic shock, reproducing the physiopathology of polymicrobial
80 sepsis in humans that is caused by bowel perforation, colitis, or postoperative peritonitis
81 (Garrido et al., 2004).

82

83 **2. Material and Methods**

84 **2.1 Venom**

85 The lyophilized crude *T. serrulatus* scorpion venom (Tsv) was obtained from the
86 Arthropod Laboratory of Instituto Butantan. The venom was stored at -20°C until the
87 time of use, when it was diluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS).

88 **2.2 Animals**

89 Swiss male mice (2–3 months, 20–25 g) were obtained from the Central Animal
90 House of Universidade Federal de Maranhão (UFMA) and kept at the animal house of

91 the Laboratory of Immunophysiology in a controlled environment under a 12/12-h
92 light/dark cycle. Water and food were available *ad libitum* until the day of sacrifice. The
93 animals were handled according to the guidelines of the Brazilian Society for
94 Laboratory Animal Science (SBCAL) and the Ethics Committee of UFMA (protocol
95 No. 006438/2008-68) approved the study.

96 **2.3 Experimental design**

97 The mice were shared in four groups. The first group (PBS group, n=5) received
98 only sterile PBS, the second (Tsv group, n=5) received a non-lethal dose of Tsv (200
99 $\mu\text{g}/\text{kg}$), the third (CLP group, n=10) received PBS and 6 hours later it was induced the
100 CLP and the fourth (CLP+Tsv group, n=10) received a non-lethal dose of Tsv (200
101 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and 6 hours later it was induced the CLP. The non-lethal dose was chosen
102 according to Pessini et al. (2003). All the treatments were done by subcutaneous (sc.)
103 route. Polymicrobial sepsis was induced using CLP method according to previously
104 described (Benjamim et al., 2000). Briefly, under deep anesthesia, a laparotomy was
105 performed and the cecum was mobilized and ligated below the cecal valve, punctured
106 10x with an 18-gauge needle to induce the lethal sepsis. The cecum was replaced into
107 peritoneal cavity and the abdomen was closed in two layers. Saline (0.5 mL/10 g body
108 weight) was given subcutaneously to CLP animals for fluid resuscitation. After 12 hours
109 of CLP a half of the animals was sacrificed with an overdose of the anesthetic (150
110 mg/kg ketamine hydrochloride and 120 mg/kg xylazine hydrochloride) to perform the
111 assays. Another half of the animals were maintained alive to evaluate the lifespan. The
112 mortality of the animals was recorded every 12 h until the 5th day (Maciel et al., 2008).

113 **2.4 Isolation of peritoneal cells**

114 The peritoneal cavity of the animals was washed with 5 mL sterile PBS. Cell
115 suspensions were aspirated with a syringe and needle and transferred to conical
116 propylene tubes. The tubes were kept on ice (4°C) until the assays.

117 **2.5 Bronchoalveolar lavage (BAL) and histopathologic analyses**

118 The trachea was exposed and intubated using catheter and was instilled with 1
119 mL of cold PBS. The total number of BAL cells was determined as described bellow.
120 Thereafter, the lungs were collected, weighed, and fixed in 10% formalin for histology.
121 The histological analysis evaluated the following parameters: vascular congestion,
122 hemorrhage and cellular infiltration, according the following scores: 0-absent, 1-weak,
123 2-moderate, 3-strong. Histological evaluation was performed randomly and blindly.

124 **2.6 Total and differential count of blood, peritoneal and bronchoalveolar cells**

125 For total peritoneal cell determination, nine volumes of the cellular suspension
126 were added to 1 volume of 0.05% crystal violet dissolved in 30% acetic acid and the
127 cells were counted using a bright-line Neubauer chamber (Sigma) under a common light
128 microscopy at 400x magnification. Differential cell counts were determined using the
129 cytospin system (800 rpm/3 min), fixed, and stained with the Instant-Prov kit (Newprov,
130 Pinhais, Brazil). The percentage of cell subpopulations was calculated based on the
131 count of 100 cells and transformed in absolute number based on the total counting.
132 Blood smears were prepared and stained with the Instant-Prov kit (Newprov, Pinhais,
133 Brazil). The slides were examined under a common light microscopy at 1000x
134 magnification. The percentage of cell subpopulations was calculated based on the count
135 of 100 cells.

136 **2.7 Lymph node, spleen and bone marrow's cells counting**

137 After sacrifice, the femur, spleen and inguinal lymph node were removed. The
138 femur was perfused with 1 mL of PBS for the isolation of bone marrow cells. The
139 spleen was removed, triturated with 5 mL PBS and passed through a silk sieve. The
140 inguinal lymph node was removed and triturated with 1 mL RPMI medium
141 supplemented with L-glutamine and 10% fetal bovine serum. Nine volumes of the
142 cellular suspension were added to 1 volume of 0.05% crystal violet dissolved in 30%
143 acetic acid and the cells were counted using a bright-line Neubauer chamber (Sigma)
144 under a common light microscopy at 400x magnification.

145 **2.8 Quantification of cytokines by the CBA technique**

146 The cytometric bead array (CBA) technique was used for the quantification of
147 IL-12, MCP-1, IL-6, IL-10, TNF- α , and IFN- γ . The mouse inflammatory cytokine kit
148 was obtained from Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA). Serum or
149 bronchoalveolar lavage (BAL) samples obtained 12 h after the CLP, were centrifuged at
150 1500 rpm for 10 min at room temperature for the precipitation of debris. Next, 25 μ L of
151 the standard, provided by the manufacturer, or the samples to be tested was mixed with
152 the detection reagent from the kit. The samples were incubated 2 hours at room
153 temperature, protected from light. After, the samples were suspended in 500 μ L of wash
154 buffer to each assay tube and centrifuge at 200g for 5 minutes. The samples were
155 suspended in 150 μ L of wash buffer to each assay tube and read in a FACSCalibur flow
156 cytometer (Becton Dickinson). The cytometer was calibrated using three samples of
157 setup beads previously incubated with FITC or PE, or without any developing reagent
158 according to manufacturer instructions. After reading of the standards and samples, the
159 data were analyzed with the BD CBA Isotype Analysis software (Becton Dickinson).
160 The results are expressed as pg/mL for each cytokine.

161 **2.9 Hydrogen peroxide assay**

162 To evaluate H₂O₂ release, a horseradish peroxidase-dependent phenol red
163 oxidation micro assay was used (Pick and Mizel, 1981; Pick and Keisari, 1980). In this
164 assay two million peritoneal cells were suspended in 1 mL freshly prepared phenol red
165 solution that consisted of ice-cold Dulbecco's PBS containing 5.5 mM dextrose, 0.56
166 mM phenol red (Sigma) and 8.5 U/mL horseradish peroxidase type II (Sigma). One
167 hundred microliters of the cell suspension were added to each well, and incubated in the
168 presence or not of 10 ng phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma), for 1 h at 37°C in a
169 humid atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. The plates were centrifuged once at
170 150x g for 3 min and the supernatants were collected and transferred to another plate.
171 The reaction was stopped with 10 µL 1N NaOH. The absorbance was measured at 620
172 nm with a micro plate reader (MR 5000, Dynatech Laboratories Inc., Gainesville, VA,
173 USA). Conversion of absorbance to µM H₂O₂ was done by comparison to a standard
174 curve obtained with known concentrations of H₂O₂ (5–40µM).

175 **2.10. Statistical Analysis**

176 Results were expressed as the mean ± standard deviation. Statistical analysis was
177 performed using the *t* test or analysis of variance (ANOVA) followed by multiple
178 comparison test (Newman-Keuls) using the Graph Pad Prism software, version 5.0. The
179 differences were considered to be significant when $p \leq 0.05$. Mice lifespan was
180 demonstrated using the Kaplan-Meier curve and the log-rank statistical test was applied
181 to compare the curves. All experiments were repeated for at least two times.

182 **3. Results**

183 **3.1 Effect of pretreatment with Tsv on the lethality induced by CLP**

184 The sepsis induced by CLP was lethal to 100% of the animals 24 hours after
185 CLP. In sharp contrast, 100% of the animals pretreated with Tsv 6 h before CLP were
186 still alive 5 days after CLP.

187 **3.2 Effect of pretreatment with Tsv on pulmonary inflammation**

188 CLP induced pulmonary inflammation with cellular infiltration, vascular
189 congestion and hemorrhage. Vascular congestion and hemorrhage were not present in
190 the group pretreated with Tsv (Table 1), but cellular infiltration, which was identified
191 via histological analysis of the lungs (Table 1 and Fig. 1A, B) and the evaluation of
192 cells recovered by bronchoalveolar lavage (BAL), were present in reduced numbers
193 (Fig. 1C). The envenomation *per se* did not alter the number of cells in the BAL (PBS
194 group, $14 \pm 6 \times 10^4$ cells/mL vs. Tsv group, $10 \pm 6 \times 10^4$ cells/mL). It is important to
195 emphasize that the CLP+Tsv group exhibited the same number of cells in the BAL as
196 the non-septic mice.

197 **3.3 Production of cytokines**

198 Cytokine production was analyzed both systemically (i.e., in the blood) (Table
199 2) and in the lungs (i.e., in the BAL) (Table 3). In the animals that were not subjected to
200 CLP (i.e., the PBS group), Tsv (i.e., the Tsv group) did not induce systemic or
201 pulmonary production of any cytokines, with the exception of systemic IL-10. In the
202 animals subjected to CLP, increased systemic production levels of TNF- α , IFN- γ , MCP-
203 1, IL-6 and IL-10 were observed, but only MCP-1 and IL-6 were elevated in the lungs.
204 Pretreatment with Tsv (i.e., the CLP+Tsv group) did not modify the cytokine profile in
205 septic animals, even compared to the Tsv group in non-septic mice, with the exception
206 of the large amount of systemic IL-10.

207 **3.4 Effect of pretreatment with Tsv on inflammatory cell recruitment**

208 The envenomation did not induce alterations in the total or differential cell
209 counts in the peritoneal cavity *per se*. The CLP induced an increase of the total cell
210 number in the peritoneal cavity that was not altered by Tsv pretreatment. However, the
211 differential cell counts in the CLP+Tsv group revealed an increased number of
212 macrophages and a reduced number of neutrophils when compared to the PBS group
213 (Table 4).

214 **3.5 Hematological alterations**

215 Prophylactic treatment with Tsv reversed the percent increase in the number of
216 neutrophils that was induced by sepsis. However, mice pretreated with the venom
217 presented increases in the percentages of lymphocytes and monocytes when compared
218 to the control group (Fig. 2).

219 **3.6 Effects of pretreatment with Tsv on lymphoid organs**

220 The envenomation did not induce alterations in the bone marrow and spleen cell
221 numbers, but the treatment induced a decrease in the lymph node cell number.
222 Pretreatment with Tsv reduced the numbers of bone marrow, lymph node and spleen
223 cells when compared to the CLP group (Table 5).

224 **3.7 Effect of pretreatment with Tsv on the peritoneal cell activation induced by** 225 **CLP**

226 Pretreatment with Tsv significantly increased *ex vivo* hydrogen peroxide release
227 by peritoneal cells when compared to the control group. The venom increased the *ex*
228 *vivo* spontaneous and PMA-stimulated H₂O₂ released by peritoneal cells (Fig. 3). No
229 H₂O₂ secretion was induced by Tsv in non-septic mice.

230

231 **4. Discussion**

232 This study demonstrated the protective effects of the subcutaneous
233 administration of Tsv on CLP-induced sepsis. Tsv injected 6 h prior to CLP protected
234 the animals against lung inflammation and death caused by sepsis.

235 Sepsis is recognized as one cause of lung injury, and in this study, an indirect
236 insult on the lungs was likely achieved. The observed signs of lung inflammation were
237 caused by cytokines or other mediators released into blood as a result of peritonitis; the
238 main target of these mediators is represented by pulmonary endothelial cells (Rocco and
239 Pelosi, 2008). Thus, the vascular congestion, hemorrhage and cellular infiltration found
240 in the lungs of septic animals without Tsv pretreatment might have been caused by
241 inflammatory cytokines (i.e., TNF- α , IL-6 and MCP-1) that were released into the
242 blood and that then acted on lung vessels and endothelial cells. During sepsis,
243 proinflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α , IL-12, MCP-1, among others, are up-
244 regulated and play roles in the complex network of interactions associated with sepsis
245 (Cavaillon et al., 2003). Because inflammatory and anti-inflammatory cytokines are
246 involved in the dysfunctions observed during sepsis, we first investigated the production
247 of selected cytokines (i.e., IL-6, IL-12, TNF- α , IL-10 and MCP-1) under those
248 conditions and the effects of Tsv pretreatment on cytokine production.

249 Here, pretreatment with Tsv failed to modify the levels of inflammatory
250 cytokines found in the blood 12 h after CLP but increased the level of IL-10 found in
251 the sera from septic animals. This increase was detected in non-septic mice receiving
252 Tsv and in greater amounts in the septic group pretreated with Tsv. This overproduction
253 of IL-10 that was induced by Tsv in septic mice likely protected the animals against
254 sepsis lethality and lung inflammation. We previously demonstrated that Tsv
255 administration via the subcutaneous route promotes systemic alterations in cellular
256 mobilization and cytokine secretion. In fact, inflammatory and anti-inflammatory

257 cytokines are also produced during human moderate to severe envenomation (Fukuhara
258 et al., 2003) and in experimental models of envenomation using Tsv (Petricevichi and
259 Peña, 2002; Pessini et al., 2003).

260 Despite the rapid production of inflammatory cytokines (i.e., TNF- α and IL-6
261 were produced 30 and 120 min after Tsv administration, respectively), significant
262 production of the inflammatory cytokine IL-10 occurred 6 h after Tsv administration
263 (Fialho et al., 2011). This time corresponded with the time at which we induced the
264 CLP in the mice; thus, the milieu was primarily and persistently anti-inflammatory. This
265 effect could explain the observed reduction of lung inflammation and the improvement
266 in survival.

267 IL-10 has also been detected after human envenomation (Fukuhara et al., 2003)
268 and in models of moderate to severe envenomation with *T. serrulatus* (Petricevichi and
269 Peña, 2002), *Centruroids noxius* and *Androctonus australis hector* venoms (Petricevich,
270 2006; Adi-Bessalem et al., 2008), which are all scorpions from the Buthidae family. IL-
271 10 is a mediator that is released as a part of a regulatory mechanism that limits collateral
272 damage when an immune response is established (Moore et al., 2001). Our results are
273 consistent with those reported for experimental endotoxemia (Gérard et al., 1993) and
274 CLP-induced sepsis (Van Der Poll et al., 1995), in which IL-10 production was related
275 to protection against lethality.

276 Peptides with antimicrobial activity can be detected in venoms from African
277 scorpions, as described previously (Conde et al., 2000; Corzo et al., 2001; Moerman et
278 al., 2002). In the *Tityus* genus, one report demonstrated that antibacterial peptides
279 isolated from *T. discrepans* exhibited activity against Gram-positive and Gram-negative
280 bacteria (Díaz et al., 2009). However, working with crude venoms from *T. serrulatus*
281 and *T. bahiensis*, another group found no activity against the Gram-positive bacterium

282 *Staphylococcus aureus* (Ciscotto et al., 2009). The bactericidal activity of crude venom
283 is possible and was described in a recent study that used venom isolated from
284 *Heterometrus xanthopus* (Ahmed et al., 2012). In our *in vivo* experiments, the effect of
285 Tsv on peritoneal and/or blood Gram-negative enterobacteria that extravasated after
286 CLP could be one feature that improves sepsis outcomes in mice. The *in vivo*
287 bactericidal activity of scorpion venom was demonstrated in a recent study (Cao et al.,
288 2012).

289 In addition to the possible bactericidal effects of scorpion venoms, indirect
290 activity via the production of microbicidal products by leukocytes could also be
291 associated with the survival index. In a CLP model of sepsis, the first leukocytes that
292 contact extravasated bacteria are macrophages and mast cells in the peritoneal cavity,
293 which is the initial locus of the inflammatory reaction during CLP-induced sepsis.

294 Here, we demonstrated that peritoneal cells from animals pretreated with Tsv
295 produced more H_2O_2 *ex vivo* than those from mice submitted only to CLP; even more
296 H_2O_2 was produced when such cells were co-stimulated with phorbol myristate acetate
297 (PMA). Macrophages and neutrophils are involved H_2O_2 production, and both of these
298 cell types were present in the peritoneal cavities in the CLP and Tsv-pretreated groups.
299 In the CLP group, the number of neutrophils was higher than the number of
300 macrophages. In the Tsv-pretreated group, the number of macrophages was increased
301 and the number of neutrophils was decreased compared to the CLP group. A similar
302 pattern in the number of monocytes and neutrophils was observed in the blood; at the
303 same time, a reduction in the number of cells was observed in the lymphoid organs.
304 Previously, we demonstrated that 6 h after the subcutaneous administration of Tsv, the
305 number of neutrophils was increased in the blood; this time corresponded to the moment
306 of sepsis induction in this study. However, the neutrophil number in the peritoneal

307 cavity was not changed by subcutaneous Tsv administration (Fialho et al., 2011). Taken
308 together, the data described above allow us to speculate that in the Tsv-pretreated
309 animals, there was a mobilization of immune cells from the lymphoid organs to the
310 blood and subsequently towards the peritoneal cavity, which is the focus of
311 inflammation after CLP. In the peritoneal cavity, the phagocytes stimulated by Tsv
312 interacted with bacteria that extravasated from the cecum. The subsequent high
313 production of H₂O₂ gives phagocytes an advantage when killing bacteria. In fact,
314 phagocytosis and the production of H₂O₂ and nitric oxide (NO) were observed *in vitro*
315 in Tsv-stimulated macrophages (Petricevich, 2002; Petricevich et al., 2008). The
316 augmented number of macrophages in the peritoneal cavity of Tsv-pretreated mice may
317 be related to the activation of neutrophils and resident macrophages because these cells
318 may produce MCP-1 (Speyer et al., 2004; Henderson et al., 2003).

319 Neutrophils are important effectors in the control of CLP-induced sepsis, and
320 early neutrophil depletion prior to CLP is associated with high bacteremia and rapid
321 death in animals (Hoesel et al., 2005). The outcome of sepsis is correlated with
322 neutrophil migration to the peritoneal cavity, and the presence of few neutrophils in the
323 focus of the inflammatory response is associated with a worse prognosis (Alves-Filho et
324 al., 2005; Alves-Filho et al., 2010). Considering the involvement of immune cells, our
325 results suggest that after Tsv pretreatment, more neutrophils in the blood were ready to
326 migrate towards the peritoneal cavity soon after the trigger of sepsis by CLP; as a result,
327 extravasated bacteria were killed by neutrophils and macrophages, which were both
328 activated by Tsv, thus avoiding the establishment of fatal sepsis.

329

330 Acknowledgements

331 We thank the Brazilian funding agencies CAPES, CNPq, FAPESP, and
332 FAPEMA for financial support. We also thanks to Thiare Fortes, Aramys Reis and
333 Anne Karine Assunção for technical assistance.

334

335 Conflict of interest statement

336 None declared

337 **References**

338

339 Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F. 2008. Pathophysiological
340 effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: tissue damages and
341 inflammatory response. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60, 373-380.

342 Ahmed, U., Mujaddad-ur-Rehman, M., Khalid, N., Fawad, S. A., Anees, F. 2012.
343 Antibacterial activity of the venom of *Heterometrus xanthopus*. *Indian J. Pharmacol.* 44,
344 509–511.

345 Alves-Filho, J. C., Benjamim, C., Tavares-Murta, B. M., Cunha, F. Q. 2005. Failure of
346 neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the
347 outcome of this syndrome. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 100 (Suppl. I), 223-226.

348 Alves-Filho, J. C., Spiller, F., Cunha, F. Q. 2010. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock*,
349 34 (Suppl. 1), 15-21.

350 Amitai, Y. 1998. Clinical manifestations and managements of scorpion envenomation.
351 *Public. Health Rev.* 26, 257-263.

352 Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M.
353 R. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence,
354 outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29, 1303-1310.

- 355 Benjamim, C. F., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q. 2000. Role of nitric oxide in the failure
356 of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect. Dis.* 182, 214-223.
- 357 Borges, A., Op den Camp, H. J. M., De Sanctis, J. B. 2011. Specific activation of
358 human neutrophils by scorpion venom: A flow cytometry assessment. *Toxicol. In vitro*,
359 25, 358-367.
- 360 Cao, L., Dai, C., Li, Z., Fan, Z., Song, Y., Wu, Y., Cao, Z., Li, W. 2012. Antibacterial
361 activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative *in vitro* and *in vivo*.
362 *PLoS One.* 7, 1-11.
- 363 Cavaillon, J. M., Adib-Conquy, M., Fitting, C., Adrie, C., Payen, D. 2003. Cytokine
364 cascade in sepsis. *Scand. J. Infect. Dis.* 35, 535-544.
- 365 Ciscotto, P., Machado de Avila, R. A., Coelho, E. A. F., Oliveira, J., Diniz, C. G.,
366 Fariás, L. M., Carvalho, M. A. R., Maria, W. S., Sanchez, E. F., Borges, A., Chávez-
367 Olórtégui, C. 2009. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino
368 acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon.* 53, 330-341.
- 369 Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., Possani, L. D. 2000. Scorpine, an anti-
370 malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471, 165-
371 168.
- 372 Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S. 2001.
373 Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the
374 scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.* 359, 35-45.
- 375 Díaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J. D., Sherman, N. E., Fox, J. W.
376 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion
377 venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes.
378 *Toxicon* 54, 802-817.

379 Fialho, E. M. S., Maciel, M. C. G., Silva, A. C. B., Reis, A. S., Assunção, A. K. M.,
380 Fortes, T. S., Silva, L. A., Guerra, R. N. M. Kwasniewski, F. H., Nascimento, F. R. F.
381 2011. Immune cells recruitment and activation by *Tityus serrulatus* scorpion venom.
382 *Toxicon* 58, 480-485.

383 Frolkis, I., Klein, Y., Locker, C., Adi, N., Dahan, E., Uretzsky, G., Shapira, I., Sorkine,
384 P. 2010. *Vipera aspis* venom reduces lethality and down-regulates tumor necrosis
385 factor- α . in a rat model of LPS-induced sepsis. *Cytokine* 49, 319–324.

386 Fukuhara, Y. D. M., Reis, M. L., Dellalibera-Joviliano, R., Cunha, F. Q. C., Donadi, E.
387 A. 2003. Increased plasma levels of IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in patients
388 moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* 41, 49-
389 55.

390 Garrido, A. G., Poli de Figueiredo, L. F., Rocha e Silva, M. 2004. Experimental models
391 of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir. Bras.*19, 82-88.

392 Gérard, C., Bruyins C., Marchant A., Abramowicz D., Vandenabeele P., Delvaux A.,
393 Fiers W., Goldman M., Velu, T. 1993. Interleukin 10 reduces the release of tumor
394 necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* 177:
395 547-550.

396 Henderson, R. B., Hobbs, J. A. R., Mathies, M., Hogg, N. 2003. Rapid recruitment of
397 inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* 102, 328-335.

398 Hoesel, L. M., Neff, T. A., Neff, S. B., Younger, J. G., Olle, E. W., Gao, H., Pianko, M.
399 J., Bernacki, K. D., Sarma, J. V., Ward, P.A. 2005. Harmful and protective roles of
400 neutrophils in sepsis. *Shock* 24, 40-47.

401 Maciel M. C. G., Farias J. C., Maluf M. J., Gomes E. A., Pereira P. V. S., Aragão-Filho
402 W. C., Frazão J. B., Costa G. C., Sousa S. M., Silva, L. A., Amaral, F. M. M, Russo M.,

- 403 Guerra R. N. M. Nascimento F. R. 2008. *Syzygium jambolanum* treatment improves
404 survival in lethal sepsis induced in mice. BMC Complement. Altern. Med. 8, 57-64.
- 405 Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen,
406 K., Tytgat, J., Van Eldere, J., Van der Walt, J., Verdonck, F. 2002. Antibacterial and
407 antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from
408 southern Africa. Eur. J. Biochem. 269, 4799-4810.
- 409 Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A. 2001. Interleukin-10
410 and the interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 19: 683-765.
- 411 Pessini, A. C., Souzam A. M., Faccioli, L. H., Gregório, O. Z. M., Arantes, E. C. 2003.
412 Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in
413 mice. Int. Immunopharmacol. 3, 765-774.
- 414 Petricevich, V. L. 2002. Effect of *Tityus serrulatus* venom on cytokine production and
415 the activity of murine macrophages. Med. Inflamm. 11, 23-31.
- 416 Petricevich, V. L. 2006. Balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in mice
417 treated with *Centruroides noxius* scorpion venom. Med. Inflamm. 6, 1-11.
- 418 Petricevich, V. L. 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. Med.
419 Inflamm., 2010, 1-16.
- 420 Petricevich, V. L., Reynaud, E., Cruz, A. H., Possani, L. D. 2008. Macrophage
421 activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion
422 toxins from *Tityus serrulatus*. Clin. Exp. Immunol., 154, 415-423.
- 423 Petricevichi, V. L., Peña, C. F. 2002. The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion
424 in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. Med. Inflamm., 11, 173-180.
- 425 Pick, E., Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of
426 hydrogen peroxide produced by cells in culture. J. Immunol. Methods 38, 161-170.

- 427 Pick, E., Mizel, D. 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and
428 hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme
429 immunoassay reader. *J. Immunol. Methods* 46, 211-226.
- 430 Rittirsh, D., Flierl, M. A., Ward, P.A. 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis.
431 *Nature Reviews. Immunol.* 8, 776-787.
- 432 Rocco, P. R. M., Pelosi, P. 2008. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory
433 distress syndrome: myth or reality? *Curr. Opin. Crit. Care* 14, 50-55.
- 434 Severino, D. N, Pereira, R. L, Knysak, I, Cândido, D. M., Kwasniewski, F. H. 2009.
435 Edematogenic activity of scorpion venoms from the buthidae family and the role of
436 platelet-activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms.
437 *Inflammation* 32, 57-64.
- 438 Silva, E., Pedro, M. A., Sogayar, A. C. B., Mohovic, T., Silva, C. L. O., Janiszewski,
439 M., Cal, R. G. R., Sousa, E. F., Abe, T. P., Andrade, J. Matos, J. D., Rezende, E.,
440 Assunção, M., Avezum, A., Rocha, P. C. S., Matos, G. F. J., Bento, A. M., Corrêa, A.
441 D., Vieira, P. C. B., Knobel, E. 2004. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES
442 study). *Crit. Care* 8, 251-260.
- 443 Speyer, C. L., Gao, H., Rancilio, N. J., Neff, T. A., Huffnagle, G. B., Sarma, J. V.,
444 Ward, P. A. 2004. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils
445 during sepsis *Am J Pathol.* 165, 2187-2196.
- 446 Van Der Poll, T., Marchant, A., Buurman, W. A., Berman, L., Keogh, C. V., Lazarus,
447 D. D., Nguyen, L., Goldman, M., Moldawer, L. L., Lowry, S. F. 1995. Endogenous IL-
448 10 protects mice from death during septic peritonitis. *J. Immunol.* 155, 5397-5401.
- 449 Wang, H., Li, W., Li, J., Rendon-Mitchell, B., Ochani, M., Ashok, M., Yang, L., Yang,
450 H., Tracey, K. J., Wang, P., Sama, A. E. 2006. The aqueous extract of a popular herbal

451 nutrient supplement, *Angelica sinensis*, protects mice against lethal endotoxemia and
452 sepsis. J. Nutr. 136, 360-365.

453 Yang J., Dai, Y., Xia, Y. F., Huang, W. Z., Wang, Z. T. 2009. *Alpinia katsumadai*
454 Hayata prevents mouse sepsis induced by cecal ligation and puncture through
455 promoting bacterial clearance and downregulating systemic inflammation. *Phytother.*
456 *Res.* 23, 267-273.

457 Zoccal, K. F., Bitencourt, C. S., Secatto, A. S., Sorgi, C. A., Bordon, K. C. F., Sampaio,
458 S. V., Arantes, E. C., Faccioli, L. H. 2011. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2
459 and Ts6 induce macrophage. activation and production of immune mediators. *Toxicon*
460 57, 1101-1108.

461

462

463 **FIGURE LEGENDS**

464 **Figure 1. Pulmonary inflammation in septic mice treated with *Tityus serrulatus***
465 **venom (Tsv).** The mice were injected subcutaneously with PBS (CLP) or Tsv (200
466 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and submitted to CLP 6 h later. The BAL fluid was collected 12 hours after
467 CLP, and the lungs were removed and fixed in 10% formalin. The lung histology of
468 either the CLP (A) or the Tsv group (B) was evaluated at 400 \times magnification. The
469 number of leucocytes in the BAL fluid was quantified (C). The results are expressed as
470 the means \pm SD of 5 animals per group. * $p<0.05$ compared to CLP.

471 **Figure 2. Differential cell counts in the blood of septic mice pretreated with *Tityus***
472 ***serrulatus* venom (Tsv).** The mice were injected subcutaneously with PBS (CLP) or
473 Tsv (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and submitted to CLP 6 h later. Blood samples were collected 12 h
474 after CLP to prepare the slides. The results are expressed as the means \pm SD of 5 animals
475 per group. * $p<0.05$ compared to CLP.

476
477 **Figure 3. *Ex vivo* hydrogen peroxide release by peritoneal cells from septic mice**
478 **treated with *Tityus serrulatus* venom (Tsv).** The mice were injected subcutaneously
479 with PBS (CLP) or Tsv (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and submitted to CLP 6 h later. The peritoneal cells
480 were collected 12 h after CLP and were cultured in the presence or absence of PMA to
481 quantify H_2O_2 secretion. The results are expressed as the means \pm SD of 5 animals per
482 group. * $p<0.05$ compared to CLP, # $p<0.05$ compared to spontaneous release.

483

Table 1. Evaluation of pulmonary inflammation. The mice were injected subcutaneously with PBS (CLP) or Tsv (200 μ g/kg) and submitted to CLP 6 h later. The lungs were removed and fixed in 10% formalin 12 hours after CLP. The lung histology of either the CLP (A) or the Tsv group (B) was evaluated at 400 \times magnification.

	CLP	CLP+Tsv
Hemorrhage	2.3 \pm 0.5 ^a	0.0 \pm 0.0*
Vascular congestion	3.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0*
Cell Infiltration	2.3 \pm 0.5	1.0 \pm 0.0*

^a The results are expressed as the means \pm SD from the scores: 0-absent, 1-weak, 2-moderate, 3-strong.

N = 5 animals per group. * p<0.05 when compared to control.

Table 2. Cytokine levels in the serum of non-septic or septic mice treated with *Tityus serrulatus* venom (Tsv). Mice were injected subcutaneously with PBS or Tsv (200 μ g/kg). A half of the animals in each group were subjected to CLP 6 h later (CLP and CLP+Tsv). The blood was collected 18 hours after the Tsv injection (i.e. 12 hours after the CLP). The cytokines levels were performed in the serum using CBA assay.

	PBS	Tsv	CLP	CLP + Tsv
MCP-1	96.7 \pm 5.8	93.3 \pm 15.3	30,493.0 \pm 24703.0	29,007.0 \pm 28129.0
IL-12	44.3 \pm 11.7	42.9 \pm 12.4	50.0 \pm 10.1	50.0 \pm 13.0
IL- 6	28.2 \pm 20.8	17.6 \pm 7.9	1,099.0 \pm 2822.0	1,099.0 \pm 3135.0
TNF- α	31.3 \pm 6.4	34.7 \pm 5.8	321.1 \pm 130.6	417.2 \pm 202.4
IFN- γ	4.3 \pm 0.4	5.0 \pm 1.2	8.2 \pm 1.6	6.2 \pm 1.5
IL-10	87.9\pm4.7	111.7\pm10.1[#]	269.7\pm109.6	1,343.0\pm1099.0*

^a means \pm S.D. of 5 animals per group (pg/mL)

[#]p < 0.05 when compared to PBS group. *p < 0.05 when compared to CLP group

Table 3. Cytokine levels in the bronchoalveolar lavage from non-septic or septic mice treated with *Tityus serrulatus* venom (Tsv). Mice were injected subcutaneously with PBS or Tsv (200 μ g/kg). A half of the animals in each group were subjected to CLP 6 h later (CLP and CLP+Tsv). The bronchoalveolar lavage fluid was collected 18 hours after the Tsv injection (i.e. 12 hours after the CLP). The cytokines levels were performed in the BAL using CBA assay.

	PBS	Tsv	CLP	CLP + Tsv
MCP-1	55.0 \pm 5.8	58.0 \pm 13.0	78.0 \pm 10.9 [#]	92.0 \pm 37.7*
IL-12	33.9 \pm 6.8	37.1 \pm 12.8	44.3 \pm 9.3	40.0 \pm 12.9
IL-6	16.5 \pm 9.4	13.0 \pm 0.9	177.4 \pm 13.7 [#]	380.3 \pm 341.4*
TNF- α	62.2 \pm 40.8	50.0 \pm 15.6	45.4 \pm 31.5	66.7 \pm 44.1
IFN- γ	3.7 \pm 1.2	4.3 \pm 1.4	4.1 \pm 0.9	3.9 \pm 1.1
IL-10	213.6 \pm 109.7	287.3 \pm 141.9	350.0 \pm 110.5	283.6 \pm 98.2

^a mean \pm S.D. of 5 animals per group (pg/mL)

[#]p < 0.05 when compared to PBS group.

*p < 0.05 when compared to Tsv group.

Table 4. Total and differential cell counting in the peritoneal cavity from non-septic or septic mice treated with *Tityus serrulatus* venom (Tsv). Mice were injected subcutaneously with PBS or Tsv (200 μ g/kg). A half of the animals in each group were subjected to CLP 6 h later (CLP and CLP+Tsv). The peritoneal cells were collected and counted 18 hours after the Tsv injection (i.e. 12 hours after the CLP).

	PBS	Tsv	CLP	CLP + Tsv
Total	1.2 \pm 0.2 ^a	1.3 \pm 0.2	4.6 \pm 0.8	4.2 \pm 0.7
Macrophage	1.1 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	1.7 \pm 1.0*
Neutrophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	3.9 \pm 0.9	2.3 \pm 1.7*
Lymphocytes	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
Mast cell	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

^a means \pm S.D. of 5 animals per group ($\times 10^6$ /mL)

*p < 0.05 when compared to the CLP group.

Table 5. Evaluation of prophylactic treatment with Tsv on the lymphoid organs from non-septic or septic mice treated with *Tityus serrulatus* venom (Tsv). Mice were injected subcutaneously with PBS or Tsv (200 µg/kg). A half of the animals in each group were subjected to CLP 6 h later (CLP and CLP+Tsv). The lymphoid organs were collected and counted 18 hours after the Tsv injection (i.e. 12 hours after the CLP).

	PBS	Tsv	CLP	CLP + Tsv
Bone marrow	5.7±0.5 ^a	5.2±1.4	9.0±0.4	6.0±0.3*
Lymph node	4.4±0.4	2.7±0.5 [#]	11.0±1.6	6.0±0.8*
Spleen	5.6±1.4	6.5±0.8	14.0±1.6	8.0±0.5*

^a The data are expressed as means ± SD of 5 animals per group (n=5/group)

[#] p < 0.05 when compared to PBS group.

*p < 0.05 when compared to CLP group.

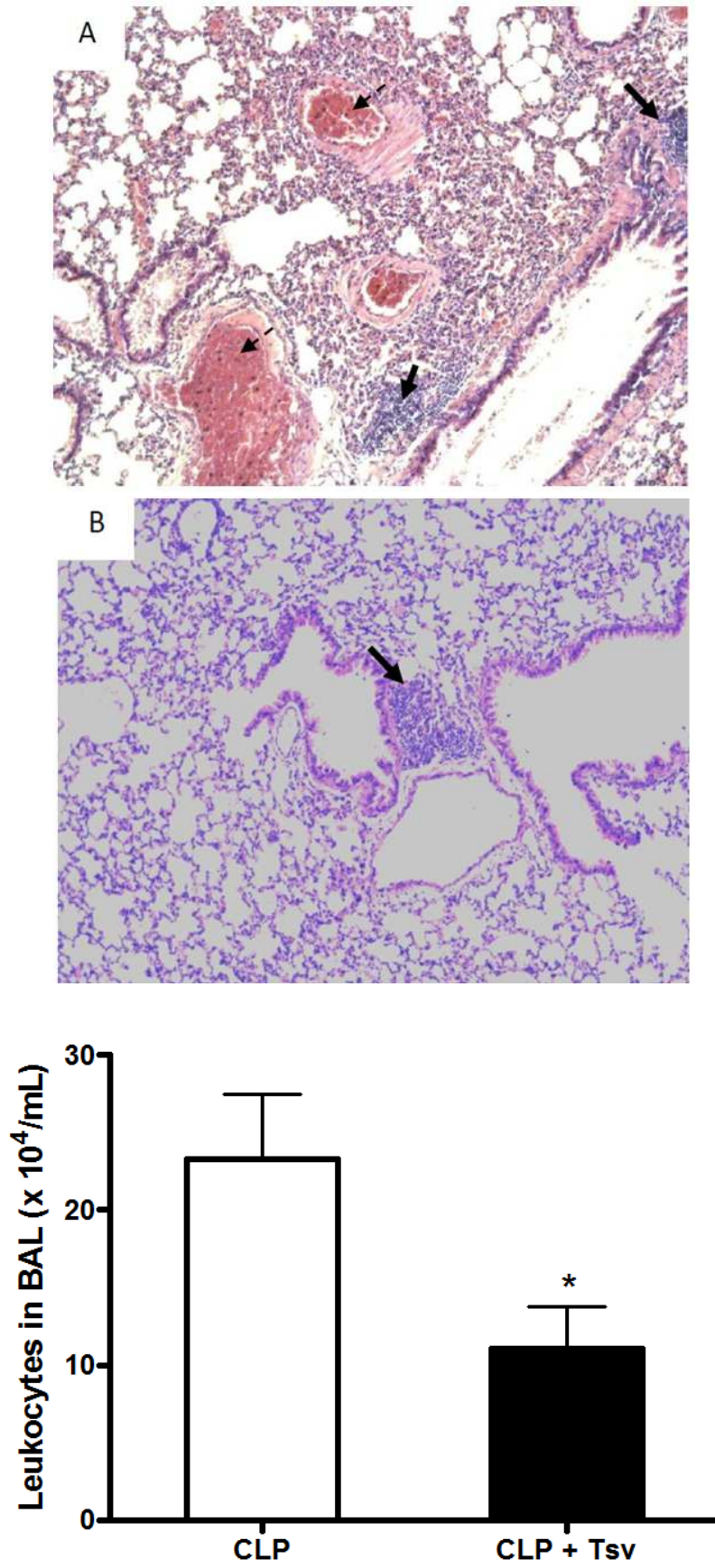


Figure 1.

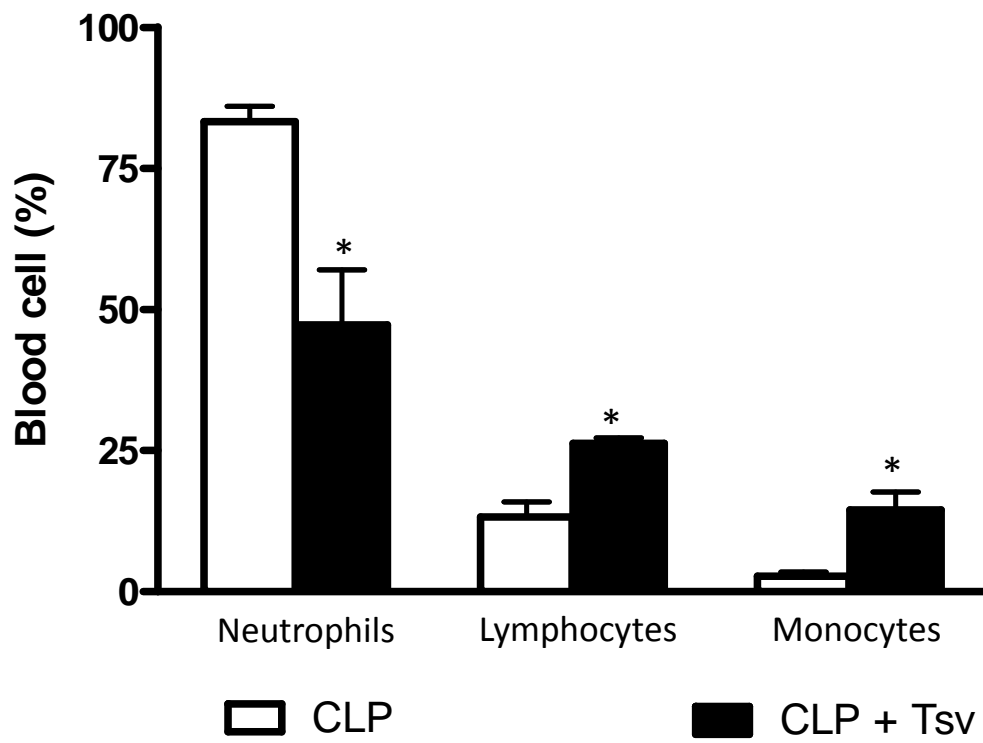


Figure 2.

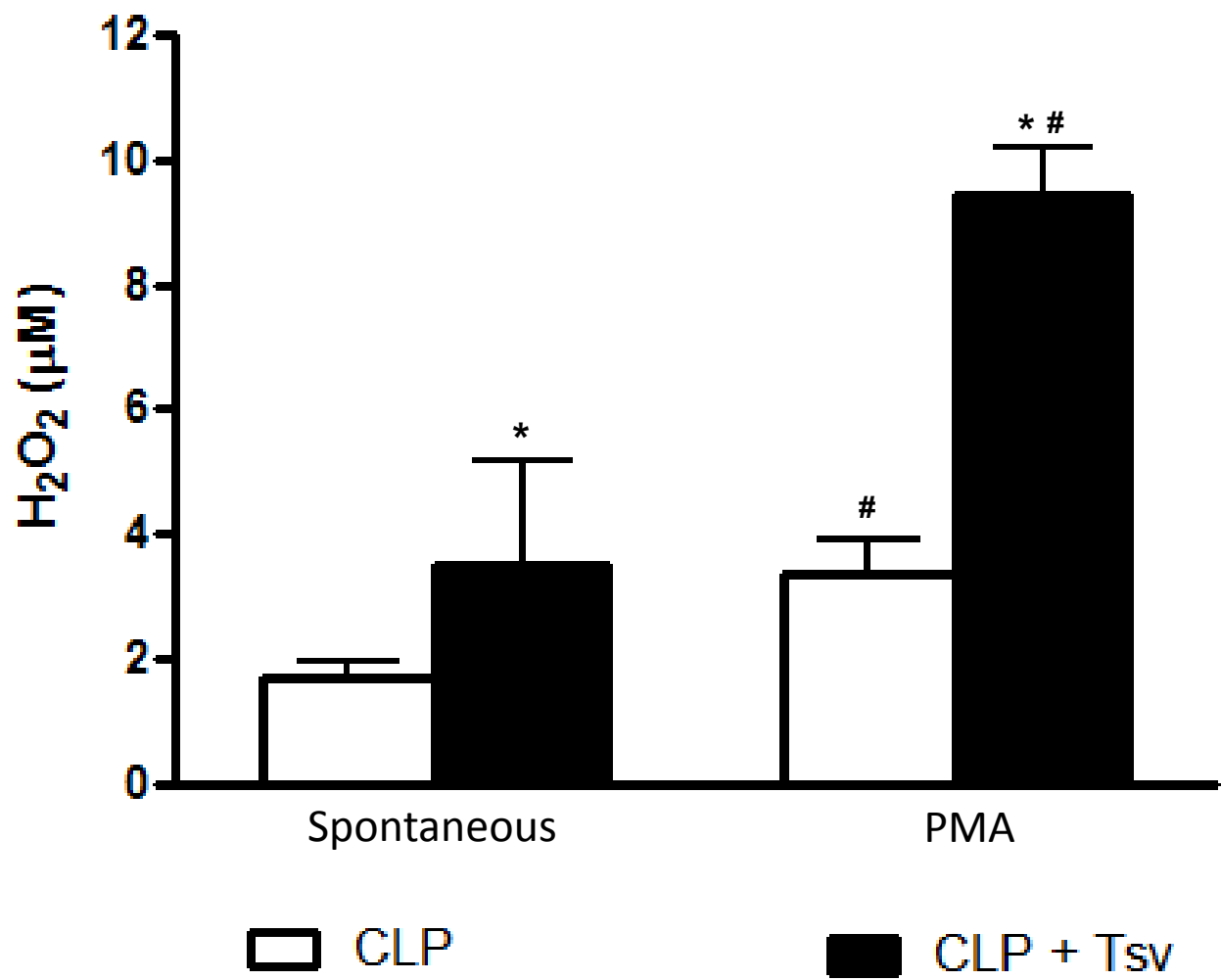


Figure 3.

The treatment with Tsv maintained 100% of septic mice alive.

The treatment with Tsv reduced the pulmonary inflammation in septic mice.

The Tsv induced an increase of regulatory IL-10 cytokine.

The Tsv decreased the neutrophil number in peritoneum and blood in septic mice

The Tsv increased the hydrogen peroxide release in septic mice.

ACCEPTED MANUSCRIPT

CONCLUSÕES DA TESE:

- Os dois venenos interferem no recrutamento celular dos órgãos linfóides, sugerindo efeito sobre a modulação da resposta imunológica;
- Os venenos induziram uma rápida resposta inflamatória tempo-dependente;
- O veneno de *T. serrulatus* causou inflamação sistêmica.
- O veneno reduziu o edema pulmonar nos animais nos quais a sepse foi induzida;
- O veneno promove a produção de mediadores relacionados à resposta inflamatória e ativação celular.
- O veneno é capaz de desenvolver uma resposta imunomodulatória, mantendo a resposta imunológica em equilíbrio, suficiente para controlar a infecção e manter a sobrevivência dos animais infectados.
- O veneno de *T. serrulatus* é um produto natural, que reduziu fortemente os efeitos deletérios induzidos pela sepse, uma vez que 100% dos animais pré-tratados com o veneno sobreviveu e teve uma inflamação pulmonar muito leve em comparação aos camundongos do grupo controle;
- O veneno é imunoestimulante, pois houve ativação celular com liberação de mediadores;
- O veneno de *T. serrulatus* induziu a produção de citocina regulatória IL-10 que contribuiu para a sobrevivência dos animais sépticos.
- O veneno é um bioproduto que futuramente poderá ser utilizado como um fármaco no controle de infecções e na manutenção da resposta imunológica em equilíbrio.