

# AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES DA CAVIDADE PERITONIAL ESTIMULADA PELO VENENO DO ESCORPIÃO *TITYUS SERRULATUS*.

Kátia Cristina Crespo Pereira<sup>1</sup> Fábio Henrique Kwasniewski<sup>2</sup>

Estudante do Curso de Biologia; e-mail [katiacriscp@hotmail.com](mailto:katiacriscp@hotmail.com)<sup>1</sup>.

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail [fhkwas@uol.com.br](mailto:fhkwas@uol.com.br)<sup>2</sup>.

**Área de conhecimento:** Imunologia

**Palavras-chaves:** *Tityus serrulatus*; Macrófagos; Espriamento; Fator ativador de plaquetas.

## INTRODUÇÃO

Os escorpiões da família Buthidae são considerados de importância médica, pois as toxinas de sua peçonha são as mais potentes entre os representantes das 16 famílias descritas (LORET & HAMMOCK, 2001). No Brasil, os principais representantes dessa família são os escorpiões do gênero *Tityus*. Os dados epidemiológicos são obtidos principalmente dos estados do sudeste do país, onde o principal envolvido nos acidentes é o *T. serrulatus*. Essa importância acerca do mesmo deve-se ao fato de que a maioria dos acidentes letais são ocasionados por esse animal. Há fortes indícios na participação da inflamação através do envenenamento pelo *Tityus serrulatus*. Um dos indícios são a dor e formação do edema no local da picada, o que pode ser mimetizado experimentalmente. Devido ao fato de o veneno do *T. serrulatus* induzir nos acidentados um aumento significativo de citocinas na circulação sanguínea, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF (FUKUHARA e cols., 2003; Magalhães e cols., 1999), admite-se que ocorra uma inflamação sistêmica. Adicionalmente, o edema pulmonar, presente em casos graves de escorpionismo, e que pode levar à morte, parece ter um componente inflamatório com a participação do fator ativador de plaquetas (PAF) (FREIRE-MAIA & De MATOS, 1993; De MATOS e cols., 1994). A fonte celular dessas citocinas no envenenamento é incerta, porém podemos incluir, entre outros tipos celulares participantes, os macrófagos, uma vez que são células capazes de secretar várias das citocinas citadas (como as IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF e o TNF- $\alpha$ ), contribuindo assim para a inflamação desencadeada no escorpionismo. Essas células são produzidas na medula óssea e liberadas como monócitos, e posteriormente quando migram para os diferentes tecidos e cavidades adquirem características tecido-específica, permanecendo como células residentes (JOHNSTON, 1988). O espriamento dos macrófagos representa um estado de ativação nos quais as células emitem pseudópodos e pode então contactar um agente estranho, e a subsequente fagocitose que impedem a multiplicação em demasia de um microrganismo no organismo hospedeiro; em uma segunda instância os peptídeos originados da fagocitose e digestão do microrganismo serão apresentados aos linfócitos T auxiliares através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II, originando uma resposta imune adaptativa. Assim, estudos visando à ativação de macrófagos pelo veneno do *T. serrulatus* podem ajudar a entender melhor a fisiopatologia do envenenamento, bem como abrir a possibilidade de utilização do veneno, ou componentes deste, para outros fins onde a ativação de macrófagos é importante

## OBJETIVOS

Objetivo geral: Investigar a ativação de macrófagos residentes peritoniais pelo veneno de escorpião *Tityus serrulatus*.

Específico: Avaliar o espriamento desses macrófagos, retirados no período de 3, 6, 12 ou 24 horas após o envenenamento dos animais, e avaliar a participação do PAF no espriamento através do antagonista (WEB2170), após o período de 24 horas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos Swiss machos (24 a 39 g) provenientes e mantidos no biotério da Universidade de Mogi das Cruzes com ração e água *ad libitum* e em ciclo claro/escuro de 12 horas.

O veneno liofilizado do escorpião *Tityus serrulatus* (vTs) foi fornecido pela Seção de Venenos do Instituto Butantan, e mantido à -20°C até o momento de uso, quando foi diluído em PBS estéril. O antagonista do PAF, WEB 2370 (5-(2-clorofenil)-3,4-dihidro-10-metil-3-[(4-morfolinil) carbonil]-2H,7H-ciclopenta [4,5] tieno[3,2-f][1,2,4] triazolo[4,3-a][1,4] diazepino) foi cedido pela Boehringer Ingelheim, Alemanha.

No grupo controle foram injetados 300 µL de PBS estéril. Passadas 3, 6, 12 ou 24 horas, os animais foram sacrificados em atmosfera saturada de CO<sub>2</sub>. A cavidade peritoneal do animal foi lavada com 5mL de PBS para que fossem retiradas as células peritoneais, o lavado recolhido foi centrifugado por 10 minutos a 1000 RPM, o sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspenso em 1 mL de PBS, e as células foram coradas com líquido de Turk e contadas em câmara de Neubauer.

O teste de espriamento foi determinado segundo o método descrito por Rabinovitch & De Stefano (1973). Em placas de poliestireno com 24 poços foram colocados lamínulas de vidros e adicionado 100µL de PBS contendo  $1 \times 10^5$  células, as placas foram incubadas a 37°C durante uma hora. Passado esse período as lamínulas foram retiradas da placa e lavadas em PBS gelado para retirada das células não aderidas, e recolocadas novamente nas placas para serem coradas com 250µL de corante Leishman por 5 minutos; este foi descartado, e posteriormente acrescentou 150µL de água tamponada com 250µL de Leishman por 10 minutos. Após este período as lamínulas foram lavadas com água destilada e secadas ao ar livre, sendo posteriormente fixadas em lâminas de vidro com cola. As células foram avaliadas por microscopia óptica no aumento de 1000 vezes, projetada em televisor através da câmara modelo NO:OS-70D.

O espriamento foi definido como a razão entre as células espriadas e não espriadas entre um total de 100 células contadas por lamínula. Os animais do grupo tratado foram envenenados com 200µg/kg de (vTs), diluído em 300µL de PBS estéril, administrado por via intraperitoneal. Passada 3, 6, 12 ou 24 horas, os animais foram sacrificados por em câmara de CO<sub>2</sub>.

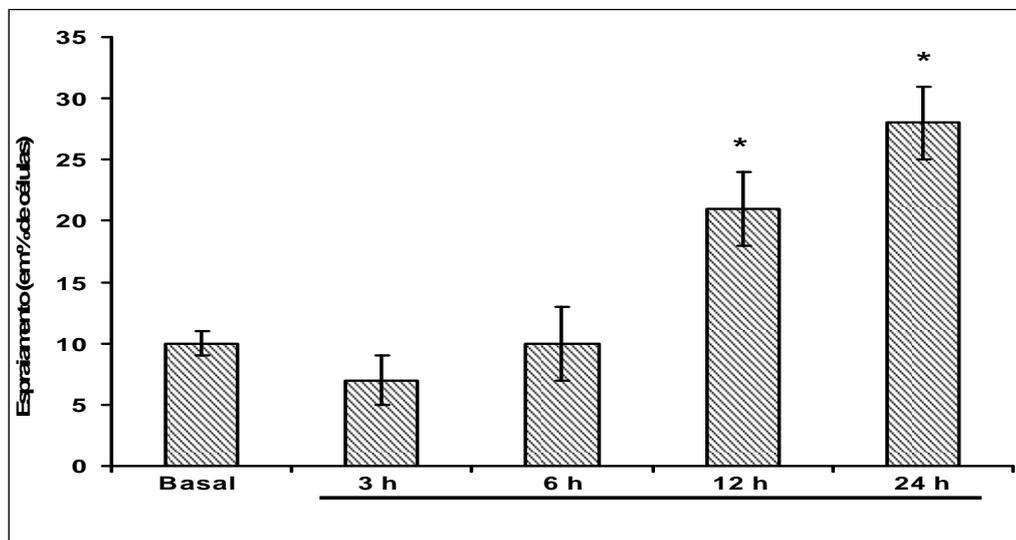
Para investigar a participação do PAF no espriamento de macrófagos de animais envenenados com o vTs, os animais foram tratados com um antagonista dos receptores do PAF, o WEB2170 (3mg/kg) administrado por via intraperitoneal 30 minutos antes do envenenamento e, após 24 horas os animais foram sacrificados, as células coletadas e o espriamento avaliado.

O procedimento para a retirada das células e avaliação do espriamento para ambos os grupos foi descrito anteriormente.

Os dados foram comparados por análise de variância, seguindo comparações múltiplas pelo teste t de Student não pareado, com  $p < 0,05$  considerado significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos tempos indicados foi analisado o espraio dos macrófagos residentes da cavidade peritoneal, demonstrado pelos gráficos do quadro abaixo.



**Figura 01:** Índice de espraio de macrófagos da cavidade peritoneal em vários períodos, o grupo basal representa o grupo controle tratado com PBS. Os resultados estão expressos como média + e.p.m. \*P<0,05 em relação ao grupo.

Na figura 1 observa-se o aumento do espraio em diferentes tempos após o envenenamento, demonstrando que quanto maior o tempo após a administração do vTs, maior é o número de células espraídas. Podemos inferir que o vTs induz o espraio de macrófagos *ex vivo*, somente após 12 horas de sua administração, aumentando o índice na 24ª hora em aproximadamente 28%. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, óxido nítrico, IL-6 e IFN- $\gamma$  por macrófagos de camundongos Balb/c estimulados *in vitro* com vTs havia sido demonstrada por Petricevich (2002). Nossos experimentos corroboram de certa forma o resultado obtido por Petricevich (2002), mas demonstram que pode haver a ativação dos macrófagos *in vivo* após a administração do vTs. O tratamento dos animais com o antagonista do PAF (WEB2170), reduziu o número de células espraídas em 33% na 24ª hora, o que demonstra que possivelmente o PAF tenha participação na ativação de macrófagos pelo vTs. Esse fato pode ter implicações no envenenamento, no qual, experimentalmente, já havia sido demonstrada a participação do PAF no edema pulmonar (FREIRE-MAIA e MATOS, 1993).

## CONCLUSÃO

O veneno do escorpião *Tityus serrulatus* induz ativação (evidenciada pelo espraio) *in vivo* de macrófagos residentes na cavidade peritoneal. O PAF parece ter importância na indução do espraio dos macrófagos pelo envenenamento com o vTs.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De MATOS, I.M., ROCHA, O.A., LEITE, R; FREIRE-MAIA, L., 1994. Lung edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118: 143-148.

FREIRE-MAIA, L., DE MATOS, I.M., 1993. Heparin or a PAF antagonist (BN 52021) prevents the acute pulmonary edema induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in the rat. *Toxicol* 31: 1207-1210.

FUKUHARA, Y.D. e cols. Increased plasma levels of IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicol* v.41, p.49-55, 2003.

LORET, E. & HAMMOCK, B. Structure and neurotoxicity of venoms. In: BROWNELL, P. E POLIS, G. (Eds.). *Scorpion Biology and Research*. Oxford University Press, New York, p. 204-233, 2001.

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