

Núbia Braga Pereira

**APOPTOSE NA PATOGENIA DO LOXOSCELISMO
CUTÂNEO EXPERIMENTAL EM COELHO –
ABORDAGENS MORFOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA**

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2010

Núbia Braga Pereira

**APOPTOSE NA PATOGENIA DO LOXOSCELISMO
CUTÂNEO EXPERIMENTAL EM COELHO –
ABORDAGENS MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Geral - Faculdade de Medicina- Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Patologia Geral
Orientadora: Profa. Luciana Moro
Coorientadores: Prof. Evanguedes Kalapothakis
Prof. Anilton Cesar Vasconcelos

Belo Horizonte

2010

P436a Pereira, Núbia Braga.
Apoptose na patogenia do loxoscelismo cutâneo experimental em coelho [manuscrito]: abordagens morfológica e imunoistoquímica. / Núbia Braga Pereira. - - Belo Horizonte: 2010.
87f.: il.
Orientadora: Luciana Moro.
Co-Orientadores: Evanguedes Kalapothakis, Anilton César Vasconcelos.
Área de concentração: Patologia Geral.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Apoptose. 2. Aracnidismo. 3. Venenos de Aranha. 4. Trombose. 5. Aranhas. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Moro, Luciana. II. Kalapothakis, Evanguedes. III. Vasconcelos, Anilton César. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: OZ 40

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
epg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **NUBIA BRAGA PEREIRA**, nº de registro 2008656050. Às nove horas do **dia vinte e seis do mês de fevereiro de dois mil e dez**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“APOPTOSE NA PATOGENIA DO LOXOSCELISMO CUTÂNEO EXPERIMENTAL EM COELHO – ABORDAGEM MORFOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA”**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, a Presidente da comissão, Profa. Luciana Moro/Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Dra. Luciana Moro/ Orientadora – UFMG
Prof. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos– UFMG
Prof. Dr. Ernane Fagundes do Nascimento– UFMG
Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Sousa – PUC/MG

Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFMG
Instituição: UFMG

Indicação: aprovada
Indicação: aprovada
Indicação: aprovada
Instituição: aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2010.

Profa Dra. Luciana Moro/Orientadora Luciana Moro

Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos Anilton Cesar Vasconcelos

Prof. Dr. Ernane Fagundes do Nascimento Ernane Fagundes do Nascimento

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza Paulo Eduardo Alencar de Souza

Prof. Wagner Luiz Tafuri/Coordenador Wagner Luiz Tafuri

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.


CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

PROF. WAGNER LUIZ TAFURI
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina/UFMG



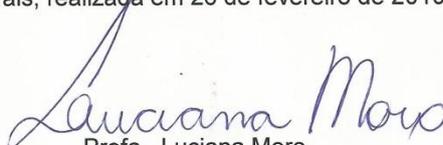
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

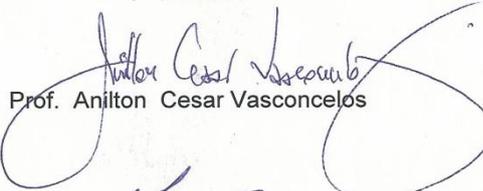
Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br

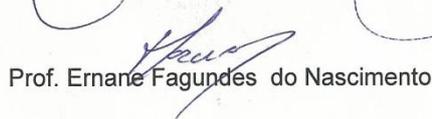


DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Luciana Moro, Anilton Cesar Vasconcelos, Ernane Fagundes do Nascimento, Paulo Eduardo Alencar de Sousa, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **“APOPTOSE NA PATOGENIA DO LOXOSCELISMO CUTÂNEO EXPERIMENTAL EM COELHO - ABORDAGEM MORFOLOGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.”**, apresentada pela mestrandia **NUBIA BRAGA PEREIRA** para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 26 de fevereiro de 2010.


Profa. Luciana Moro
Orientadora


Prof. Anilton Cesar Vasconcelos


Prof. Ernane Fagundes do Nascimento


Prof. Paulo Eduardo Alencar de Sousa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 217/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Apoptose na patogenia do loxoscelismo**", que tem como responsável(is) **Luciana Moro**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 04/2008**.

Este certificado expira-se em **9/ 04/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 217/2007**, related to the project entitled "**Apoptosis in loxoscelism pathogenesis**", under the supervisors of **Luciana Moro**, is in agreement with the Ethical Principles In Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 9, 2008**.

This certificate expires in **April 9, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Abril de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/biotica/cetes - chetes@pereg.ufmg.br

Dedico este trabalho

Ao meu esposo Wantuil pelo amor e incentivo. Obrigada pela compreensão nos meus momentos de ausência. Sou grata a Deus por sua vida e por tê-lo ao meu lado. Amo você!

À minha família, por me incentivarem a prosseguir, mesmo quando eu achava que não era mais possível. Vocês sempre acreditaram na minha capacidade e nunca mediram esforços em me ajudar. Obrigada pela renúncia, amor, dedicação e ensinamentos. Sou muito abençoada e imensamente grata a vocês. Dedico esta vitória a vocês. Mãe (Maria), Pai (Azarias), irmãos (Davidson e Henrique) e Vó Geralda: Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Deus da minha vida toda honra, glória e louvor por mais esta vitória.

À minha orientadora, professora Luciana Moro, pela confiança, oportunidade, aprendizado, pela orientação, pelo crescimento profissional que me proporcionou ao longo desses anos, através de sua dedicação e profissionalismo. Agradeço também pelos conselhos, pela amizade, puxões de orelha e boas risadas.

Ao meu coorientador professor Evanguedes, pela disposição em sempre sugerir melhorias para o experimento, pelo aprendizado e competência.

Ao meu coorientador professor Anilton Cesar Vasconcelos, pela seriedade, disciplina e exemplo profissional.

Ao professor Walter Motta, pela colaboração e suporte na criação dos coelhos.

Aos professores da banca examinadora, pela disposição, pela valiosa contribuição e correção.

À Soraia, pelos dias de peleja, pela amizade, companheirismo e pelas boas risadas ao longo desses anos.

Ao Leonardo Pereira, obrigada pelo empenho e dedicação.

Ao Francisco (Chicolino), obrigada pela amizade, pela disposição em me ajudar sempre que precisei, por compartilhar seus conhecimentos. Você é exemplo de dedicação, esforço e capacidade.

À minha amiga Livi, obrigada pela amizade, pelos bons momentos vividos e pela luz no fim do TUNEL.

À Barbara Laurice, pelo apoio, incentivo e colaboração.

A todo o pessoal do Laboratório de Apoptose, Irma Ximena, Heloisa, Marcus Vinícius, Márcia e Elisa, pelo companheirismo, colaboração e bons momentos vividos.

À professora Milene Alvarenga Rachid, pelas sugestões e preocupação com a melhoria do meu trabalho.

Aos professores Ângela Maria Quintão, Natacha e Danilo Bastos, pelas sugestões, consultoria estatística e disponibilidade.

Às bibliotecárias Maria Cecília e Ana Paula, pelo apoio na busca dos artigos quando os mesmos não estavam disponíveis e pela auxílio nas normas ABNT para a minha dissertação.

À Marlene, do Laboratório de Genética, foi através de você que esta porta se abriu. Muito obrigada!

Aos alunos do Laboratório de Genética, pela simpatia e apoio sempre que precisei.

Ao Ronaldo, da Fazenda experimental professor Hélio Barbosa, pela disposição sempre que precisei, pelo cuidado com os meus coelhos e por sua simpatia.

Ao Darci, obrigada por nunca medir esforços em me ajudar

Ao técnico Rubinho, pelos serviços prestados.

A todos os funcionários da Fazenda experimental prof. Hélio Barbosa, pela coloração.

À Profa. Lúcia e à técnica Lurdinha da Faculdade de Medicina, pela contribuição e ensinamentos na imunoistoquímica.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Patologia geral e da Secretária de pós-graduação da faculdade de medicina, pelo bom atendimento.

Ao meu pai Azarias, a minha mãe Maria e a minha vó Geralda, pelo apoio, investimento e incentivo incondicional sempre.

Aos meus irmãos Davidson e Moisés, pela amizade, amor e credibilidade.

Ao meu esposo Wantuil, pelo incentivo e amor.

Às minhas amigas Nana e Vanessa, por estarem sempre ao meu lado, por aguentar as minhas loucuras e “pitis” ao longo desse mestrado.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo financiamento.

“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, sem amor eu nada seria. Ainda que eu conhecesse todos os mistérios e toda ciência, sem amor eu nada seria”. I Coríntios 13: 1-2.

RESUMO

Acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* são um problema de relevância médica no Brasil. A picada da *Loxosceles* induz lesão dermonecrotica e hemorrágica, acompanhada, em alguns casos, de manifestações sistêmicas. A lesão dermonecrotica é antecedida pela trombose nos plexos dérmicos próximos ao local da picada. Recentemente, tem-se mostrado que a descamação de células endoteliais na proximidade da placa ateromatosa via apoptose predispõe à trombose. Apoptose é um tipo de morte celular que se processa com gasto de energia, além de síntese e degradação proteicas. Ainda não há, na literatura, a descrição das lesões histológicas produzidas pelo veneno da *L. similis* e, tampouco, estudos *in vivo* que demonstrem se o mesmo induz apoptose de células endoteliais. Os objetivos deste estudo foram: (1) analisar histologicamente e relatar, pela primeira vez, a lesão induzida na pele de coelhos injetados com o veneno de *L. similis* e (2) avaliar a importância da apoptose no mecanismo do loxoscelismo. Foram utilizados 40 coelhos Nova Zelândia, machos que foram divididos em 2 grupos: (1) controle – injetados intradermicamente com 50 µl de PBS e (2) tratado – injetados intradermicamente com 0,5 µg de veneno bruto diluído em 50 µl de PBS. Os grupos foram analisados 2, 4, 6 e 8 horas após a injeção. Fragmentos de pele foram colhidos, fixados em formol tamponado a 10% e processados rotineiramente para a inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram corados em HE. Algumas secções foram submetidas à reação de TUNEL e a imunistoquímica para Bax. Algumas amostras de pele foram também fixadas em glutaraldeído para inclusão em metacrilato. Secções de 3 µm foram coradas em HE. A análise microscópica mostrou que o veneno bruto da *L. similis* induz a uma lesão caracterizada por: edema envolvendo toda a derme e se estendendo até o músculo cutâneo, trombose em todas as camadas da derme, infiltrado inflamatório predominantemente heterofílico, necrose fibrinóide em paredes arteriolares, hemorragia dérmica e necrose do músculo cutâneo. A intensidade da lesão progrediu com o intervalo de tempo. Além destas alterações, a partir de 2 horas de injeção do veneno, observou-se, em alguns vasos, a presença de células endoteliais contraídas, apresentando perda de adesão entre si e com a matriz extracelular (anoiquia), contendo núcleo retraído, carioteca irregular e cromatina condensada, caracterizando apoptose. Algumas secções foram submetidas à reação de TUNEL e a imunistoquímica para Bax. A consequente descamação do endotélio via apoptose parece ser o principal fator indutor de trombose nos plexos dérmicos que culmina com a dermonecrose característica do loxoscelismo cutâneo. Com base no presente estudo pode-se concluir que o veneno de *L. similis* induz apoptose de células endoteliais.

Palavras chaves: Apoptose, loxoscelismo, trombose.

ABSTRACT

Accidents with *Loxosceles* spiders represent a relevant medical problem in Brazil. The *Loxosceles* bite to a dermonecrotic and hemorrhagic injury that can be followed by systemic manifestations. The dermonecrotic injury is preceded by thrombus formation in dermal vessels near to the bite site. It was shown recently that apoptosis of endothelial cell surrounding atherosclerotic plaques predisposes to thrombosis. Apoptosis is a kind of cellular death that is carried out with energy expenditure, besides protein synthesis and degradation. Up to now, there are no studies *in vivo* showing whether the poison of *L. similis* induces apoptosis of endothelial cells. Additionally, there are no descriptions of the histological lesion induced by the *L. similis* bite. The aim of this study is: (1) to analyze histologically at first, the induced injury in the skin of rabbits inoculated with the poison and (2) to evaluate the importance of apoptosis in the mechanism of the loxoscelism. Forty male rabbits were divided in 2 groups: (1) control - inoculated intradermally with 50 μ l of PBS and (2) treated- inoculated intradermally with 0,5 μ g of the *L. similis* crude venom diluted in 50 μ l of PBS. Animals were analyzed 2, 4, 6 and 8 hours after inoculation. Fragments of skin were collected, fixed in 10% buffered formalin, routinely processed and paraffin embedded. Sections of 5 μ m were stained with HE. Some sections were submitted to the TUNEL reaction and other sections were submitted to immunohistochemical detection of Bax. Skin samples were also fixed in glutaraldehyde and embedded in methacrylate. Sections 3 μ m thick were stained with HE adapted to methacrylate. The crude *L. similis* venom induces a lesion characterized by oedema, inflammatory infiltrate predominantly heterophilic, fibrinoid necrosis of the arterial and arteriolar walls, thrombosis in all dermal layers and necrosis of the cutaneous muscle whose intensity progressed with the time interval. The lesion intensity increased with the inoculation time becoming into severe heterophilic dermatitis 8 hours post inoculation. A similar lesion is observed in experiments using the crude venom of other *Loxosceles* species. Additionally, 2 hours post inoculation, shrunken endothelial cells were noted, losing adhesion one to another and to the extracellular matrix (anoykic cells), containing basophilic nuclei, and condensed chromatin, suggesting apoptosis. Some sections were subjected to TUNEL assay and immunohistochemistry for Bax. Present data suggest that the crude *L. similis* venom induces apoptosis of endothelial cells. On the basis of the present study it can be concluded that the poison of *L. similis* induces apoptosis of endothelial cells.

Keywords: Apoptosis, loxoscelism, thrombus

Figura		Pág
Figura 1-	<i>Loxosceles laeta</i> : fêmea e macho.....	21
Figura 2-	<i>Loxosceles reclusa</i> : detalhe dos 3 pares de ocelos.....	21
Figura 3-	Loxoscelismo provocado pela picada da <i>Loxosceles</i>	22
Figura 4-	Diagrama ilustrando as características morfológicas observadas no processo de morte celular via apoptose.	26
Figura 5 -	Sequência de eventos envolvidos na apoptose.....	28
Figura 6 -	Estágios do processo de apoptose	30
Figura 7-	Endotélio e o controle da homeostasia vascular	32
Figura 8-	Hemostasia: vasoconstrição local devido à lesão vascular, hemostasia primária e hemostasia secundária.....	35
Figura 9-	Tríade de Virchow.....	36
Figura 10-	Resposta á lesão vascular.....	37
Figura 11-	Criatório da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa/UFMG galpão de alojamento dos coelhos.....	44
Figura 12-	Representação Esquemática do delineamento Experimental	45
Figura 13-	Pele de coelho: lesão e o espalhamento radial após a injeção e a difusão do mesmo até a camada muscular.....	52

Figura 14-	Pele de coelho: dissociação de fibras e células caracterizando edema (coloração HE).	54
Figura 15-	Pele de coelho: angiectasia, hiperemia e hemorragia (coloração azul de toluidina).....	55
Figura 16 –	Pele de coelho: trombos oclusivos em todos os intervalos de tempo (setas) (coloração HE).....	56
Figura 17-	Pele de coelho: deposição de fibrina (incluídos em metacrilato e corados em azul de toluidina).....	57
Figura 18-	Pele de coelho: Infiltrado inflamatório nos diferentes intervalos de tempo (coloração HE).....	58
Figura 19-	Pele de coelhos: necrose do músculo cutâneo com o passar do tempo (coloração HE). CM: Camada Muscular.....	59
Figura 20-	Pele de coelhos: manguito perivascular (coloração HE).....	60
Figura 21-	Pele de coelhos incluídos em metacrilato e corados em azul de toluidina: apoptose de células endoteliais (perdendo a adesão com a parede do vaso e condensação de cromatina).....	64
Figura 22 –	Fragmentos de pele de coelhos incluídos em metacrilato e corados em azul de toluidina: apoptose de células endoteliais na interface trombo-vaso (setas) após 2 horas de injeção do veneno.....	65
Figura 23 -	Marcação de heterófilos via reação de imunistoquímica para calprotectina, contra-coloração com hematoxilina.....	66
Figura 24 -	Pele de coelho: células endoteliais marcadas positivamente para as reações de TUNEL.....	66

Figura 25-	Pele de coelho: células endoteliais marcadas positivamente para as reações de TUNEL; é possível observar trombos se formando dentro dos vasos.....	67
Figura 26-	Pele de coelho: células endoteliais apresentando marcação positiva para as reações de <i>Bax</i> na interface trombovaso.....	68
Gráfico 1-	Número de acidentes provocados pela <i>Loxosceles</i> entre os anos de 2001 e 2008 notificados em Minas Gerais.....	18
Gráfico 2-	Cálculo do número mínimo de campos representativos para contagem de células do infiltrado inflamatório.....	48
Gráfico 3-	Mensuração da espessura da pele dos coelhos.....	61
Gráfico 4	Mensuração do diâmetro médio dos vasos sanguíneos.....	62
Gráfico 5	Análise quantitativa da dinâmica do número de células do infiltrado inflamatório nos diferentes intervalos de tempo (2, 4, 6 e 8) horas após injeção do veneno.....	63
Quadro 1-	Produtos das células endoteliais e homeostase vascular.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>L. similis</i>	<i>Loxosceles similis</i>
<i>L. laeta</i>	<i>Loxosceles laeta</i>
<i>L. anômala</i>	<i>Loxosceles anômala</i>
MI	Mililitro
MEC	Matriz extracelular
V	Voltagem
Kg	Quilogramas
µL	Microlitro
µm-	Micrometros
µg-	Micrograma
mM-	Milimolar
M –	Molar
HE-	Hematoxilina-eosina
PBS-	Do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
TBS –	Do inglês <i>Tris buffered saline</i>
EDTA-	Ácido etilenodiaminotetraacético
TdT –	Transferase terminal de Deoxinucleotídeo
DAB –	Diamino benzidina
TUNEL	Do inglês <i>Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUPT nick end-labelling</i> – Marcação <i>in situ</i> da fragmentação do genoma com terminal transferase de deoxinucleotídeo.
CEMEL –	Centro de Microscopia eletrônica
UFMG –	Universidade Federal de Minas Gerais
ICB-	Instituto de Ciências Biológicas
SINAN –	Sistema Nacional de Agravos Notificáveis
FAPEMIG-	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
BCL 2-	Do inglês <i>B cell lymphoma 2</i> – Gene do Linfoma de células B
P53-	Do inglês <i>Protein 53</i> – Proteína 53
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1- Introdução.....	18
2- Revisão de literatura.....	20
2.1 Loxoscelismo.....	20
2.1.1 Gênero <i>Loxosceles</i>	20
2.1.2 Características do Loxoscelismo.....	21
2.1.3 Características histopatológicas provocadas pelo veneno da <i>Loxosceles</i>	23
2.1.4 Composição bioquímica do veneno da <i>Loxosceles</i>	24
2.2 Apoptose.....	24
2.3 O endotélio.....	31
2.3.1 Biologia da célula endotelial.....	31
2.4 Patogenia da trombose.....	34
2.4.1 Hemostasia.....	34
2.4.2 Trombose.....	35
2.5 Apoptose e alterações endoteliais no Loxoscelismo.....	38
3 Objetivos.....	43
4 Material e Métodos.....	44
4.1 Aprovação pelo Comitê de ética em Experimentação Animal.....	44
4.2 Obtenção do veneno.....	44
4.3 Estudo <i>in vivo</i> em coelhos.....	44
4.4 Inclusão em Metacrilato.....	46
4.5 Coloração em Metacrilato.....	46
4.6 Análise morfométrica.....	47
4.7- Marcações de heterófilo através da reação de Imunoistoquímica.....	48
4.8- Identificação <i>in situ</i> da fragmentação do DNA (técnica de TUNEL).....	49
4.9- Reação de Imunoistoquímica para Bax.....	50
4.10- Análise estatística.....	51
5- Resultados.....	52
6- Discussão.....	69
7- Conclusão.....	74
8- Referências Bibliográficas.....	75

1 INTRODUÇÃO

Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever o conjunto de sinais e sintomas resultantes, dos acidentes provocados pela picada de aranhas do gênero *Loxosceles*, que são conhecidas popularmente como “aranhas-marrons”. Tais acidentes podem induzir dois tipos de quadros clínicos distintos: o quadro cutâneo ou dermonecrótico e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (DA SILVA *et al.*, 2004). O desenvolvimento de um dos dois quadros vai depender de alguns fatores relacionados ao indivíduo, tais como: estado nutricional, idade, local da picada, quantidade de veneno inoculado, tempo decorrido entre o acidente e o tratamento e a susceptibilidade ao veneno (GAJARDO-TOBAR, 1966; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1994; DA SILVA *et al.*, 2004).

Em Minas Gerais, há relatos de três espécies de *Loxosceles*: *L. similis*, *L. laeta* e *L. anomala* (GERTSCH, 1967; ÁLVARES *et al.*, 2004). Em Belo Horizonte, Machado *et al.*(2005) fizeram o primeiro registro de *Loxosceles similis* em residências. Entre os anos de 2001 e 2008 foram notificados 864 acidentes por *Loxosceles* (SINAN, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010) em Minas Gerais (GRAF.1). Somente em 2007 foram registradas 269 notificações no interior de MG (dados da pesquisa). Provavelmente, acidentes com aranhas-marrons são ainda mais frequentes, mas não são devidamente diagnosticados e/ou registrados devido à falta de um teste diagnóstico específico, dificuldades para o diagnóstico clínico, captura e identificação do agente agressor (MACHADO *et al.*, 2005).

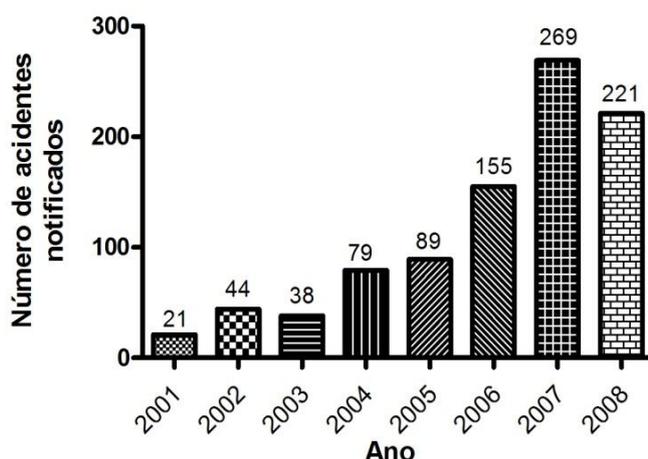


GRÁFICO 1- Número de acidentes provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* notificados entre os anos de 2001 e 2008 em Minas Gerais (PEREIRA *et al.*, 2010).

Devido à importância médica do loxoscelismo no Brasil e ao fato da *L. similis* ter sido encontrada nas residências de Belo Horizonte, faz-se pertinente estudar a histopatologia do loxoscelismo. Ainda não há na literatura uma descrição histopatológica da lesão provocada pela *L. similis*, tampouco, estudos *in vivo* que demonstrem se o mesmo induz apoptose de células endoteliais. Este estudo tem como objetivo descrever pela primeira vez as alterações histológicas ocorridas após a injeção experimental, intradérmica, de veneno bruto de *L. similis* em coelhos e avaliar a importância da apoptose no mecanismo do loxoscelismo.

A apoptose é um tipo de morte celular que se processa com gasto de energia, além de síntese e degradação proteica. Diversas evidências mostram que a apoptose de células endoteliais exerce um papel importante na biologia e patologia vascular. Inicialmente a apoptose pode ser detectada durante os processos de regressão dos arcos aórticos, aorta abdominal e ducto arterioso (FISHER *et al.*, 2000; AFFARA *et al.*, 2007). Recentemente, tem-se mostrado que a descamação da placa ateromatosa via apoptose predispõe à trombose. Doenças como lúpus eritematoso sistêmico, vasculites (WOYWODT *et al.*, 2003), rejeição de transplantes (KRUPNICK *et al.*, 2002; HALL & JEVNIKAR, 2003) e alterações não cardiovasculares como as neoplasias, têm sido associadas com a apoptose de células endoteliais (CARMELIET & JAIN, 2000).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Loxoscelismo

2.1.1- Gênero *Loxosceles*

O gênero *Loxosceles* é composto por aranhas que apresentam uma coloração típica que varia entre o marrom claro e marrom escuro, podendo apresentar mancha clara (*Loxosceles gaucho*) ou mancha escura (*Loxosceles laeta*) no cefalotórax. Seu comprimento corporal e das patas variam de 8 a 15 mm e de 8 a 30 mm, respectivamente. Os machos têm o corpo menor e patas mais longas que as fêmeas (FUTRELL, 1992; VETTER; VISSCHER, 1998) (FIG. 1).

A característica desse gênero é o formato do cefalotórax que lembra um violino (FUTRELL, 1992), o qual apresenta 6 ocelos dispostos em três díades, formando uma linha curva (FIG. 2), glândulas apócrinas, aparelho inoculador de veneno, composto por um par de quelíceras, que são diminutas (0,3mm) o que sugere ser a injeção do veneno intradérmica, deixando no local da picada dois sinais justapostos (FOIL & NORMENT, 1979; TRENTINI, 2005).

Estas aranhas vivem sob tijolos e telhas empilhados, pedras, troncos de árvores, fendas de muros e cavernas. Em algumas situações elas habitam as residências humanas, onde encontram o ambiente ideal para a sua sobrevivência, abrigando-se em frestas, armários e outros locais (GERTSCH, 1967; MACHADO *et al.*, 2005). Tais aranhas não constroem teias regulares, mas sim aglomerados de fios semelhantes a algodão esfiapado (TRENTINI, 2005). A aranha marrom não é agressiva. A maior parte dos acidentes loxoscélicos ocorre quando o animal é comprimido contra a pele.

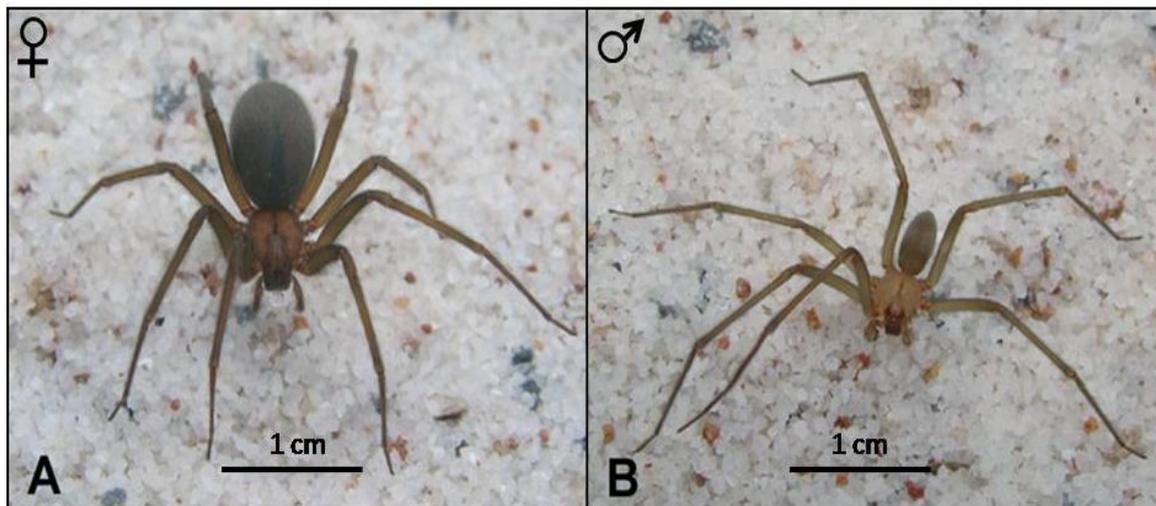


FIGURA 1 - *Loxosceles laeta*: (A) Fêmea e (B) Macho. Adaptado de SILVEIRA (2009).

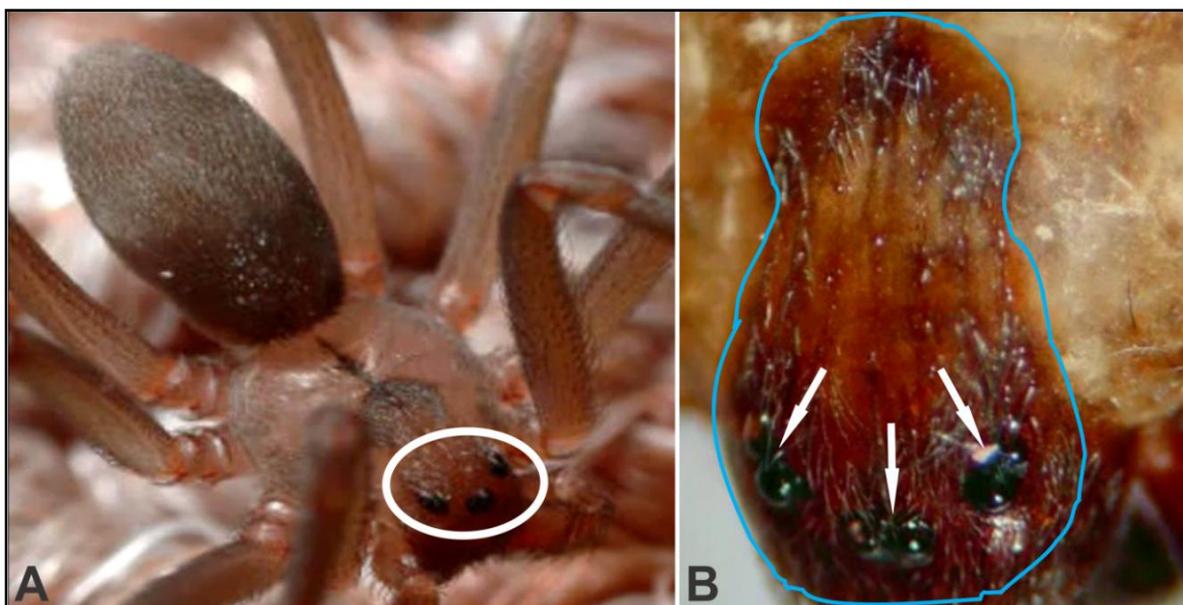


FIGURA 2 - *Loxosceles reclusa*: (A) aranha marrom com detalhe dos 3 pares de ocelos (círculo branco), (B) setas brancas indicando os pares de ocelos formando um U e cefalotórax em formato de violino (área contornada em azul). Fotos e adaptações de imagens de vídeos (BUGTUBEORG, 2009; FERRER, 2010).

2.1.2 Características do Loxoscelismo

Acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* são um problema de relevância médica no Brasil. A picada pela *Loxosceles* conduz a um conjunto de sinais e sintomas, denominado loxoscelismo, que pode se manifestar sob dois

quadros clínicos distintos: o quadro cutâneo ou dermonecrótico e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico. O quadro cutâneo ocorre em 84 a 97% dos casos (BARBARO *et al.*, 1992; CHAIM, 2005) e se caracteriza por dermonecrose no local da injeção do veneno (REES, *et al.*, 1984). Em casos menos graves, a picada por *Loxosceles*, causa uma reação local muito leve e indolor, que geralmente passa despercebida pelo paciente. Após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada a intensa e é descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência. Pode haver dois pequenos pontos no local da picada, onde se observam uma área clara e uma área avermelhada edemaciada, conhecida como placa marmórea. Depois de alguns dias, o local da picada apresenta-se uma porção central com consistência endurecida, além da ocorrência da difusão radial do veneno (FIG. 3) (RODRIGUES *et al.*, 1986; FUTRELL, 1992; Da SILVA *et al.*, 2004; SWASON *et al.*, 2006). A cicatrização ocorre por segunda intenção, se consolidando após 6 a 8 semanas. Em casos mais raros pode ocorrer a formação de uma ulcera de difícil cicatrização (FIG. 3).

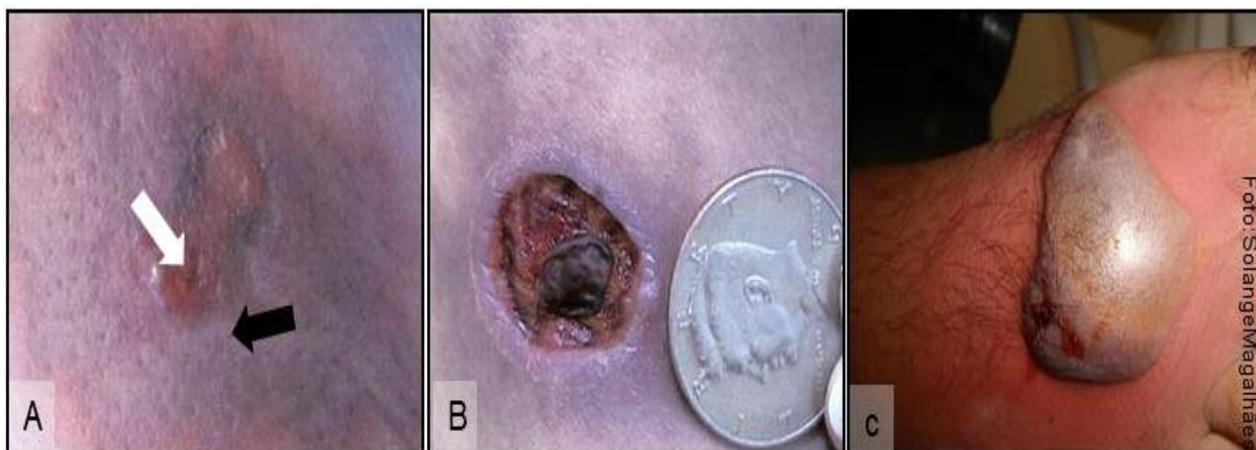


FIGURA 3- Loxoscelismo provocado pela picada da *Loxosceles* - (A) Visualização macroscópica da dermonecrose, seta branca (local de injeção do veneno) e seta preta (difusão radial do veneno); (B) Lesão com ulceração central; (C) caso clínico diagnosticado como Loxoscelismo: bombeiro, 31 anos, relatou ter calçado bota pela manhã e trabalhado por aproximadamente 12h. Após esse período começou a sentir dor progressivamente maior, com queimação, no pé direito. (A e B) Adaptado de SWASON *et al.*(2006) e (C) cedida por SCHUTZE & MAGALHÃES (2010).

O loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico ocorre com menor frequência (3 – 16% dos casos) e é observado apenas nos casos mais graves. As primeiras

manifestações aparecem após 24 horas e os sintomas incluem, além da reação local, astenia, febre, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia, insônia e, nos casos mais graves, convulsões e coma. Pode também ocorrer prurido generalizado e petéquias (MARTINEZ-VARGAS, 1987; SCHENONE *et al.*, 1989; FUTRELL, 1992; BRAVO *et al.*, 1993).

2.1.3 Alterações histopatológicas provocadas pelo veneno da *Loxosceles*

Dados clínicos de pacientes humanos após a picada demonstram endurecimento no local da picada e eritema. A biopsia constata inflamação aguda, trombose, hemorragia e a necrose coagulativa da epiderme (Da SILVA *et al.*, 2004).

A literatura sugere que as características clínicas e laboratoriais encontradas nos acidentes naturais são semelhantes às observadas em modelo animal, principalmente quando se utiliza coelhos (FUTRELL *et al.*, 1992; ELSTON *et al.*, 2000, VEIGA *et al.*, 2000 e VEIGA *et al.*, 2001b).

Alterações histopatológicas descritas no loxoscelismo experimental em coelhos, utilizando veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* confirmam os dados histopatológicos descritos acima (PIZZI *et al.*, 1957; REES *et al.*, 1981; STRAIN *et al.*, 1991; FUTRELL, 1992; YANNIAS, 1992; SUNDERKOTTER *et al.*, 2001; OSPEDAL *et al.*; 2002).

Ospedal *et al.* (2002) estudaram o efeito da *L. intermedia* em coelhos, que receberam intradermicamente 40 µg do veneno a partir de 4 horas de injeção e observaram edema, deposição de fibrina, trombose na derme, degeneração da parede vascular e infiltrado inflamatório perivascular. Na camada muscular foi observado edema, infiltrado inflamatório heterofílico (neutrofílico em outras espécies) e rabdomiólise. Destruição da epiderme e hemorragia extensa também foram descritas. Quatorze dias após o envenenamento Elston (2000) relatou infiltrado inflamatório misto, necrose coagulativa e vasculite. Todos os animais apresentaram uma zona bem delineada de heterófilos em toda a derme e epiderme.

2.1.4 Composição Bioquímica do veneno da *Loxosceles*

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* é composto por enzimas e moléculas biologicamente ativas produzidas por glândulas situadas no cefalotórax da aranha. No que diz respeito aos constituintes protéicos, o veneno é rico em proteínas de baixo peso molecular variando entre 5-40 kDa e, expressando, em menor extensão, proteínas de alto peso molecular de 60 a 850 kDa (VEIGA *et al.*, 2000a). Quanto às moléculas biologicamente ativas, estão presentes: sais inorgânicos, aminoácidos livres, ácidos nucleicos, monoaminas e poliaminas neurotóxicas (DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004). Diversas toxinas têm sido identificadas e caracterizadas bioquimicamente no veneno loxoscélico, entre elas as mais estudadas são as fosfolipases D (TAMBOURGI *et al.*, 1995; BARBARO *et al.*, 1996; CUNHA *et al.*, 2003; CHAIM *et al.*, 2006; Da SILVEIRA *et al.*, 2006; Da SILVEIRA *et al.*, 2007a; APPEL *et al.*, 2008), metaloproteases e serinoproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a; Da SILVEIRA *et al.*, 2007b) e hialuronidases (FUTRELL, 1992; YOUNG & PINCUS, 2001; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007c). Tais proteínas têm sido descrita por Kalapothakis *et al.*, (2007), como a família de proteínas *Loxtox*, que inclui a esfingomielinase D, a proteína SMA, a proteína de dermonecrótica (DP) e o fator dermonecrótico que estão associados com os efeitos dermonecróticos e sistêmicos (FUTRELL *et al.*, 1979; TAMBOURGI *et al.*, 1998; LUCIANO *et al.*, 2004; KUSMA *et al.*, 2008).

2.2 Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular ativa, cuja execução depende de energia, síntese (KERR & SEARLE, 1972) e degradação protéicas. Toda célula possui a maquinaria de apoptose estando pronta para induzi-la, a menos que seja sinalizada a sobreviver (MALLAT & TEDGUI, 2000).

A apoptose tem como função atuar em células que já não possuem funções no organismo, quando há excesso de células (regulando o tamanho dos tecidos), exercendo um papel oposto ao da mitose (VASCONCELOS, 1995), em células que

se desenvolvem de forma inadequada, em células que já desempenharam suas funções e naquelas que podem ser prejudiciais e devem ser eliminadas (ELLIS, 1991).

São exemplos de situações onde ocorre a apoptose fisiológica: no desenvolvimento embrionário e na organogênese, na renovação de células epiteliais, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos, na senilidade, na hipotrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou de hormônios e na involução de alguns órgãos (KERR, 1993; KERR, 1999).

Estímulos patológicos também podem induzir esse tipo de autodestruição celular, entre os quais vírus (AMEISEN & CAPRON, 1991; SHEPPARD & ASCHER, 1991; ITO *et al.*, 1997; FUGIER-VIVIER *et al.*, 1997; VASCONCELOS, 1994; VASCONCELOS & LAM, 1994; VASCONCELOS & LAM, 1995; MORO *et al.*, 2003a) toxinas, tais como: etoposídeo (MORO *et al.*, 2003b) e venenos de aranha (GAO *et al.*, 2005, PEREIRA *et al.*, 2009) e serpentes (DEBNATH *et al.*, 2007).

A apoptose é caracterizada morfologicamente: (a) pela retração celular e perda de adesão com outras células, ou com a membrana basal (anoiquia); (b) zeiose ou formação de projeções digitiformes na membrana citoplasmática; (c) condensação do citoplasma com diminuição do teor hídrico e do volume celular; (d) condensação nuclear com compactação da cromatina em massas densas uniformes, alinhadas na face interna da carioteca (crescentes) (PEITSH *et al.*, 1993); (e) convolução com posterior fragmentação da membrana nuclear (sem cariorrexe ou ruptura) e fragmentação celular com a formação dos corpos apoptóticos (KERR *et al.*, 1972). Esses últimos são fagocitados pelas células circunjacentes (canibalismo celular) (f) ou por fagócitos profissionais (FIG. 4) (SAVILL *et al.*, 1993) antes que ocorra a lise celular. Como não ocorre ruptura de células (SAVILL *et al.*, 1993), não há liberação de componentes celulares no espaço extracelular e, por conseguinte, não há indução de inflamação (FADOK & HENSON, 1998). Possivelmente, a célula em apoptose protege a sua membrana contra o risco de lise por ativação de transglutaminases. Estas enzimas promovem a ligações cruzadas entre proteínas do citoesqueleto fortalecendo, assim, a sua membrana (FESUS *et al.*, 1987).

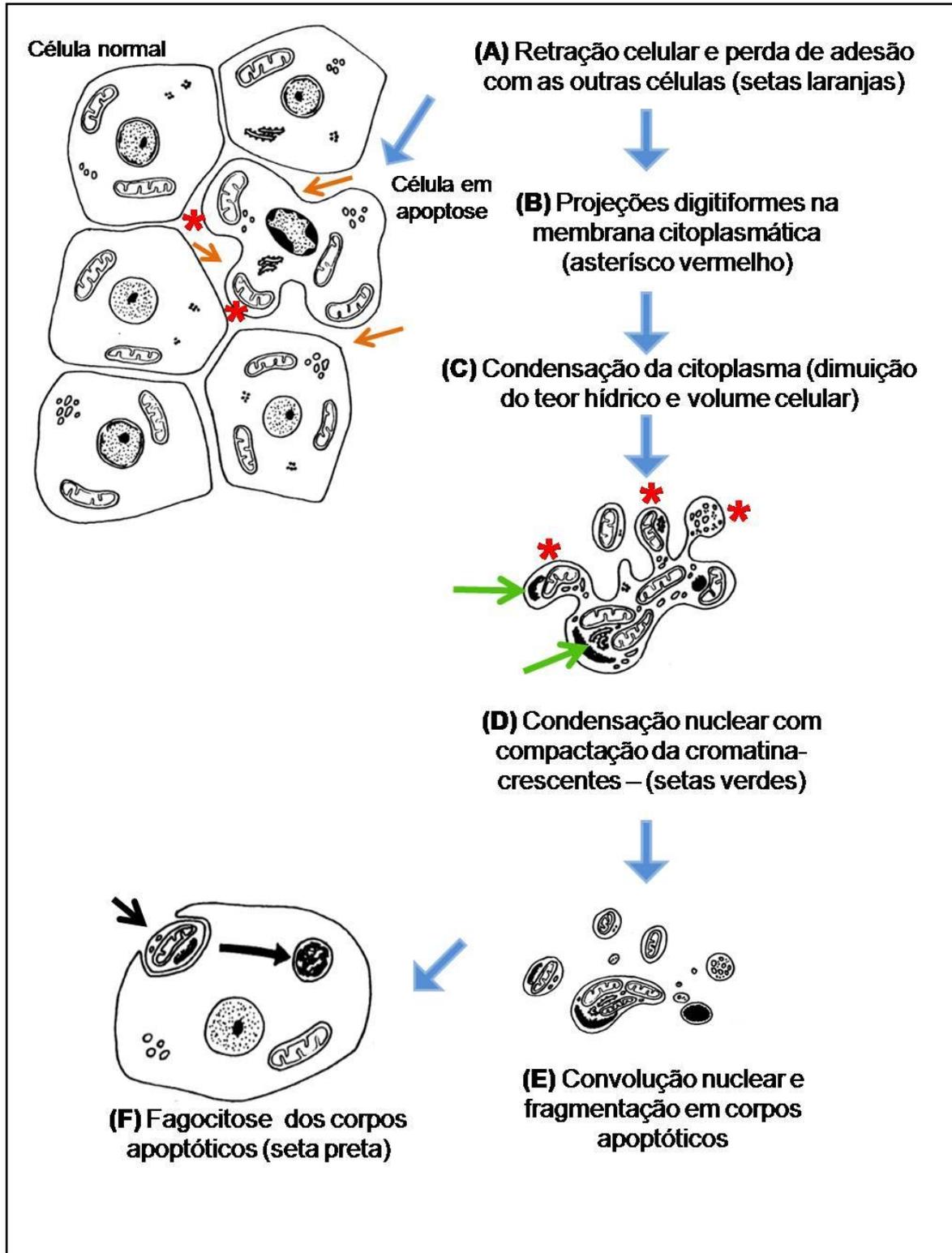


FIGURA 4- Diagrama ilustrando as características morfológicas observadas no processo de morte celular via apoptose. Adaptado de (KERR *et al.*, 1972)

A principal característica molecular do processo de apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA através de endonucleases dependentes de Ca^{+2} e Mg^{+2} . Esta clivagem internucleossômica resulta em fragmentos oligonucleossomais que podem ser demonstrados via eletroforese do DNA em gel de agarose, produzindo o clássico “padrão em escada” (WYLLIE *et al.*, 1980; COHEN & DUKE, 1992). A fragmentação internucleossômica do genoma gera inicialmente fragmentos de 50 a 300 kb e, posteriormente, de múltiplos de 180-200 pb (WYLLIE *et al.*, 1980).

A maioria das mudanças morfológicas observadas na apoptose é mediada por uma cascata enzimática envolvendo proteases de cisteína específicas de aspartato denominadas caspases (THORNBERRY *et al.*, 1997) que são ativadas neste tipo de morte celular (COHEN, 1997). Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que apresentam resíduos de ácido aspártico em sequências específicas. Elas são sintetizadas como precursores inativos que são clivados proteoliticamente para gerar subunidades ativas. Cada caspase contém sequências conservadas importantes para a atividade proteolítica, clivando o substrato a partir de Asp-Xxx produzindo resíduos específicos, o que caracteriza bioquimicamente (THORNBERRY *et al.*, 1997). A ativação das caspases promove a desmontagem da membrana nuclear e do arcabouço de laminas, a condensação da cromatina e a degradação proteolítica das estruturas nucleares e citoplasmáticas (FIG.5).

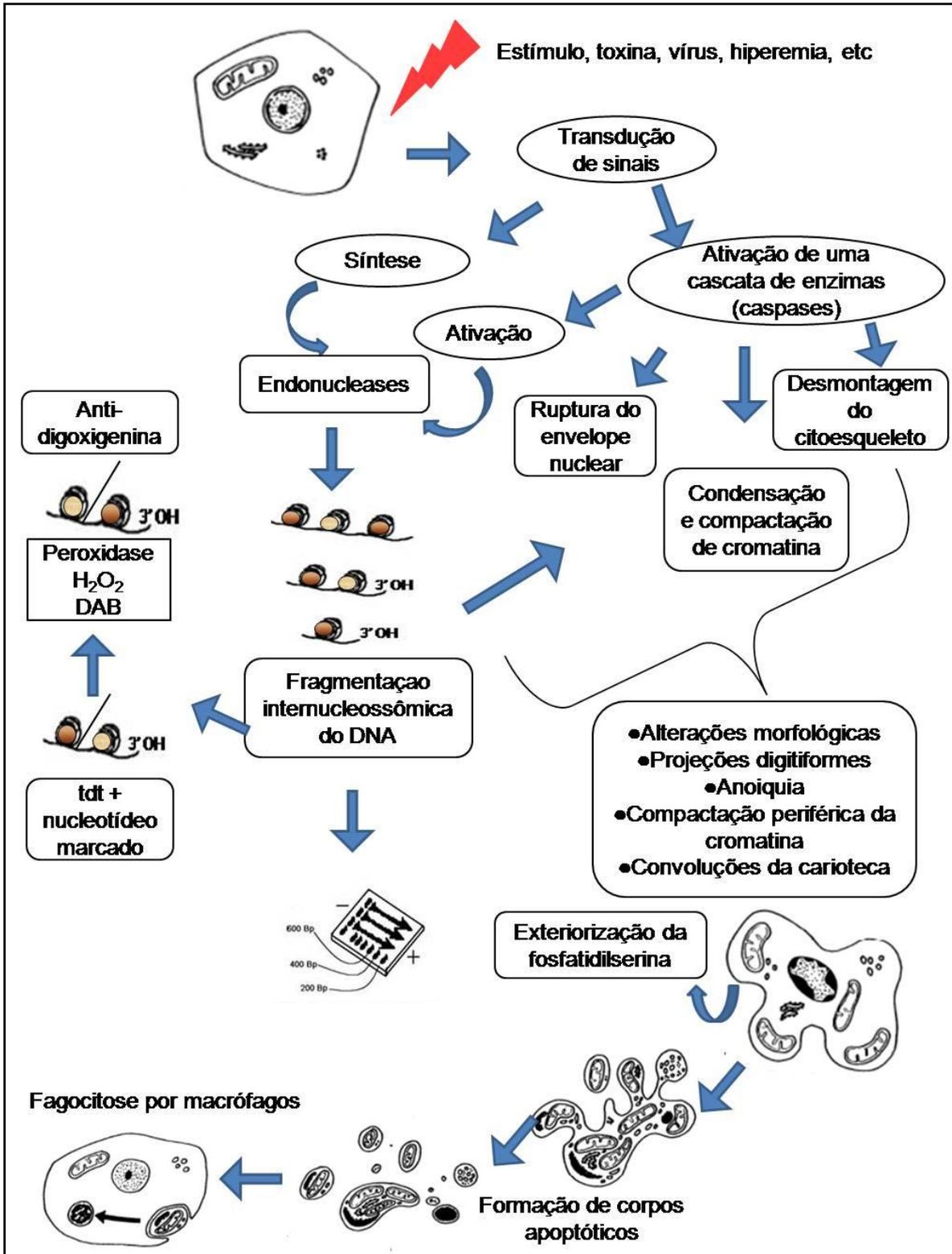


FIGURA 5- Diagrama mostrando a sequência de eventos envolvidos no processo de morte celular via apoptose.

Estas alterações são comuns nas células em apoptose, independentemente do agente indutor do processo. Isto significa que a ação destas caspases representa a via final comum que normalmente opera em células programadas para morrer (THORNBERRY *et al.*, 1997). As caspases que participam do processo de apoptose são divididas em duas classes: as iniciadoras (caspases 2, 8, 9, 10) e as executoras (caspases 3, 6 e 7) (COHEN, 1992).

O processo de apoptose requer a ativação de genes cuja expressão controla a síntese de várias enzimas, tais como: caspases, transglutaminases e endonucleases (FESUS *et al.*, 1987; ARENDS & WYLLIE, 1991; TENNISWOOD *et al.*, 1994). Algumas das famílias de genes associados à apoptose são c-myc, bcl-2, p53 e ras. Ainda não se conhece totalmente o mecanismo através do quais estes genes influenciam a célula para desencadear o processo apoptótico (WYLLIE, 1992). O primeiro gene a ser estudado foi o bcl-2, inicialmente identificado em células B de linfomas foliculares (do inglês, b “cell Lymphoma 2 gene”), em função da translocação t (14;18) (REED, 1998). A família de proteínas relacionadas à proteína Bcl-2 é dividida em: (1) membros anti-apoptóticos, tais como: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 ou Bfl-1 e Boo e (2) membros pró-apoptóticos: Bax, Bak, Bad, Mtd (Bok), Diva Bik, Bid, Bim, Hrk (DP5), Blk e Bnip3 (TSUJIMOTO & SHIMIZU, 2000), Bmf, Noxa e PUMA (CHIPUK & GREEN, 2008). Uma característica importante da família Bcl-2 é a heterodimerização entre componentes antiapoptóticos e pró-apoptóticos, inibindo assim a atividade biológica dos outros membros. Desta forma, as concentrações celulares proporcionais e a dimerização competitiva e seletiva entre as proteínas da família Bcl-2 determinam a susceptibilidade celular a apoptose (KORSMEYER, 1999). Bax é um membro pró-apoptótico que forma homo e heterodímeros. A dimerização de Bax resulta em sua translocação (GROSS *et al.*, 1998) e inserção na membrana mitocondrial (SUZUKI *et al.*, 2000) com consequente disfunção mitocondrial e ativação de caspases (GROSS *et al.*, 1998).

O processo de apoptose pode ser dividido em três estágios funcionalmente distintos (FIG.6): (1) *indução*, na qual o sinal desencadeador da morte celular é originado por via endógena ou por receptores de superfície com domínios de morte (DD - *Death Domains*); (2) *fase efetora*, na qual há ativação da cascata de caspases; e (3) *fase de degradação*, na qual a célula adquire as características

bioquímicas e morfológicas características desse processo (GREEN & KROEMER, 1998).

Após o processo de apoptose as células são removidas dos tecidos como resultado do reconhecimento específico e fagocitose por células adjacentes especializadas e/ou não especializadas através de uma variedade de mecanismos que implicam fosfatidilserina, trombospondina. A perda de assimetria da membrana fosfolipídica e a consequente exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática é uma das características iniciais de células em apoptose, e é um evento crítico no seu reconhecimento por parte de algumas populações de macrófagos (FADOK *et al.*, 1992, 1998). Além disso, células em apoptose podem gerar espécies reativas de oxigênio, que podem induzir a peroxidação da membrana.

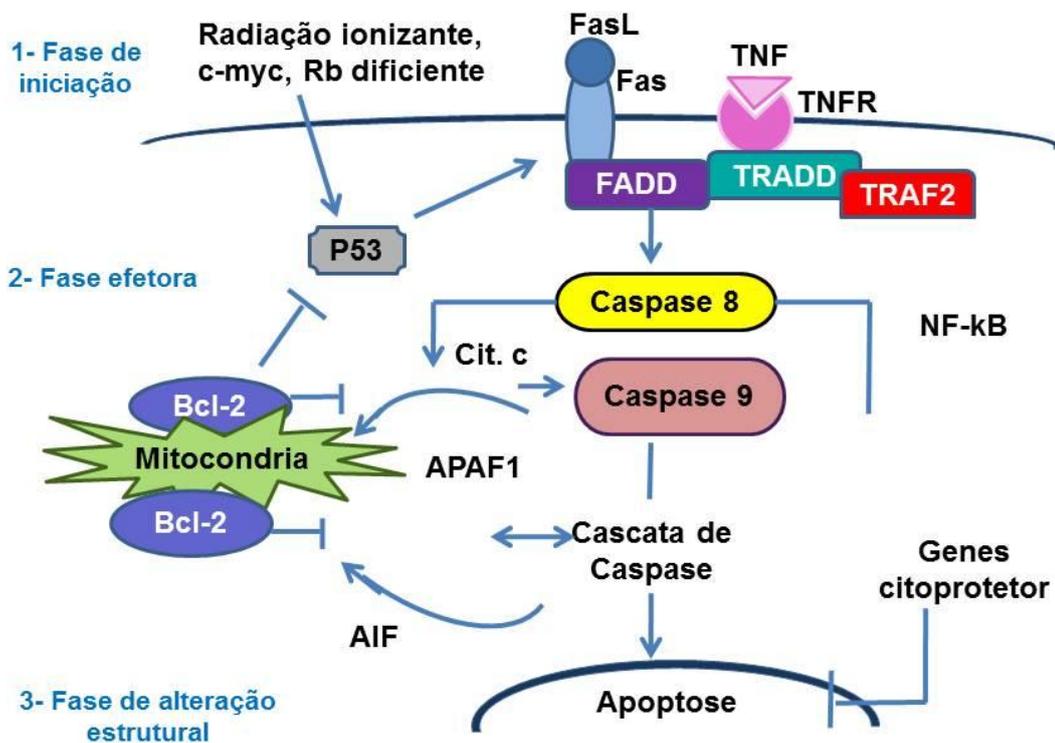


FIGURA 6: Estágios do processo de apoptose

2.3 O endotélio

2.3.1 Biologia da célula endotelial

O endotélio é uma monocamada contínua, de citoplasma marginal, com núcleos proeminentes e, formada por células ligadas entre si por diferentes tipos de estruturas de adesão ou junções célula - célula. Estas são estruturas complexas, formadas por moléculas adesivas transmembranas ligadas a uma rede de proteínas citoplasmáticas/citoesqueleto. Com base em características morfológicas e funcionais, três tipos de junções têm sido descritas para as células endoteliais: junções oclusivas, junções de ancoragem e junções comunicantes (MICHELS, 2003).

As junções oclusivas selam a camada de células endotelial e são formadas por membranas justapostas, que parecem estar parcialmente fundidas. A principal constituinte transmembrana da junção oclusiva é a ocludina associada com diversas proteínas citosólicas como a ZO-1, ZO-2 e cingulina (MICHELS, 2003).

As junções aderentes são formadas por caderinas, VE-caderina, que está presente na superfície da célula endotelial. Caderinas são moléculas de adesão celular, que ancoram com suas caudas citoplasmáticas a redes de proteínas intracitoplasmáticas celulares, cateninas que são conectadas a actina baseado no sistema de microfilamentos. Estruturas aderentes são envolvidas no controle da permeabilidade vascular para células circulantes. Elas precisam ser reguladas em coordenação com o requerimento funcional do órgão irrigado (MICHELS, 2003).

Mudanças na permeabilidade endotelial são associadas com redistribuição de caderinas e ocludinas de superfície, estabilização de adesão focal, ligações e ativação progressiva de metaloproteinase de matriz. A perda desta função de barreira pode levar ao edema. Estímulos como histamina, fator natriurético atrial, ou trombina induzem a um rápido e curto aumento da permeabilidade vascular enquanto que outras citocinas ou fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) induzem a uma resposta sustentada (MICHELS, 2003).

O endotélio é sustentado por uma membrana basal de 5-8 nm, conhecida como lâmina basal. Ela é composta por colágeno (tipo IV e V), laminina, glicoproteína e fibronectina, as quais são sintetizadas e secretadas pelas próprias células endoteliais (ANGELIS *et al.*,1996). A membrana basal é ininterrupta em capilares fenestrados contínuos, mas descontínua em sinusóides, em todos os casos formando uma barreira carregada negativamente. As células que estão adjacentes ao endotélio capilar são conhecidas como pericitos, que são cercados por uma lâmina basal endotelial e são difundidos na microvasculatura da maioria dos tecidos. Os pericitos e as células musculares lisas fornecem os elementos contráteis da parede dos capilares (ANGELIS *et al.*,1996).

Devido à sua localização estratégica na interface entre os tecidos e o sangue, o endotélio exerce um papel vital na manutenção da hemostasia e em muitos outros eventos vasculares biológicos (ANGELIS *et al.*,1996).

Anteriormente, supunha-se que o endotélio era, simplesmente, uma camada de células que revestia internamente os vasos sanguíneos formando uma simples barreira passiva. Porém, hoje se sabe que as células endoteliais regulam uma variedade de respostas biológicas que envolvem: permeabilidade, controle do tráfego de moléculas e células, transporte, biossíntese, metabolismo e manutenção da estrutura da parede vascular (FIG. 7) (BACHETTI; MORBIDELLI, 2000; CARVALHO *et al.*, 2001).

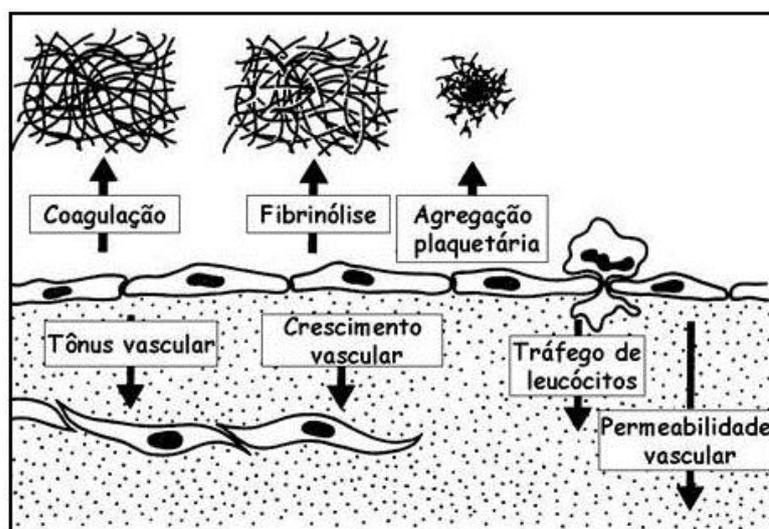


FIGURA 7 - Endotélio e o controle da homeostasia vascular – As células endoteliais participam ativamente na regulação de cada processo mostrado aqui neste esquema, que contribui para a manutenção da

homeostase vascular. Isto é geralmente ativado pela secreção ou expressão na superfície de moléculas bioativas. PEARSON (1991).

O endotélio também provê uma interface não trombogênica entre o sangue e os componentes sanguíneos, mantém a fluidez do sangue, modulando a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas e humorais e à própria estrutura vascular (BATLOUNI, 2001).

Local ativo de síntese, o endotélio pode ser considerado um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo humano, que corresponde a vários estímulos, produzindo e secretando um grande número de compostos metabolicamente ativos (QUADRO 1), além de modular ou inibir os efeitos de substâncias circulantes (BATLOUNI, 2001).

QUADRO 1- Produtos das células endoteliais e homeostase vascular

Produtos, propriedades e funções das células endoteliais

Manutenção da barreira de permeabilidade

Elaboração dos reguladores anticoagulantes, antitrombóticos e antifibrinolíticos

Prostaciclina

Trombomodulina

Ativador do plasminogênio

Elaboração de moléculas pró-trombóticas

Fator de *Willebrand*

Fator tecidual

Inibidor do ativador de plasminogênio

Produção de matriz extracelular (Colágeno, proteoglicanas)

Modulação do fluxo sanguíneo e reatividade vascular

Vasoconstritores: endotelina, ECA (Enzima Convertedora de Angiotensina)

Vasodilatadores: NO, prostaciclina

Regulação da inflamação e da imunidade

IL-1, IL-6, quimiocinas

Moléculas de adesão: VCAM-1, ICAM, E-Selectina, P-selectina

Antígenos de histocompatibilidade

Regulação do crescimento celular

Estimuladores do crescimento: PDGF, CSF, FGF

Inibidores do crescimento: Heparina, TGF- β

Oxidação do LDL

Fonte: Adaptado de BATLOUNI, 2001

2.4 Patogenia da trombose

2.4.1- Hemostasia

A hemostasia é uma consequência de processos rigorosamente controlados que mantêm o sangue em um estado fluido e livre de trombos nos vasos normais e mantêm a integridade do sistema circulatório fechado com alta pressão após um dano vascular. Lesões na parede do vaso e extravasamento de sangue da circulação rapidamente iniciam eventos na parede dos vasos e no sangue formando um tampão plaquetário (FURIE& FURIE, 2008; ROBBINS, 2008).

No estado de repouso, o endotélio funciona como um eficaz anticoagulante. Sua superfície de carga negativa repele plaquetas, o óxido nítrico e a prostaciclina inibem a função das plaquetas. As propriedades anticoagulantes são realçadas pela expressão na superfície de trombomodulina e heparan sulfato. Entretanto após estimulação por citocinas ou dano no tecido, o endotélio torna-se rapidamente pró-trombótico (AUSTIN, 2008).

Após a lesão vascular, fatores neuro- humorais locais induzem uma vasoconstrição transitória. As plaquetas aderem (através de receptor GpIb) à matriz extracelular exposta (MEC) ligando-se ao fator *Von Willebrand* (FvW), sendo, então ativadas, sofrendo uma alteração de formato e liberando seus grânulos. O difosfato de adenosina (ADP) e tromboxana A₂ (TXA₂) liberados levam à agregação plaquetária continuada (através da ligação do fibrinogênio aos receptores das GpIIb-IIIa das plaquetas) para formar o tampão hemostático primário. A ativação local da cascata de coagulação (envolvendo o fator tecidual e os fosfolípidos das plaquetas) resulta na polimerização da fibrina, “cimentando” as plaquetas em um tampão hemostático secundário definitivo. Mecanismos de contra-regulação, como a liberação de t-PA (ativador do plasminogênio tecidual, um produto da fibrinólise) e a trombomodulina (que interfere na cascata de coagulação), limitam o processo hemostático ao local da lesão (FIG. 8) (FURIE& FURIE, 2008).

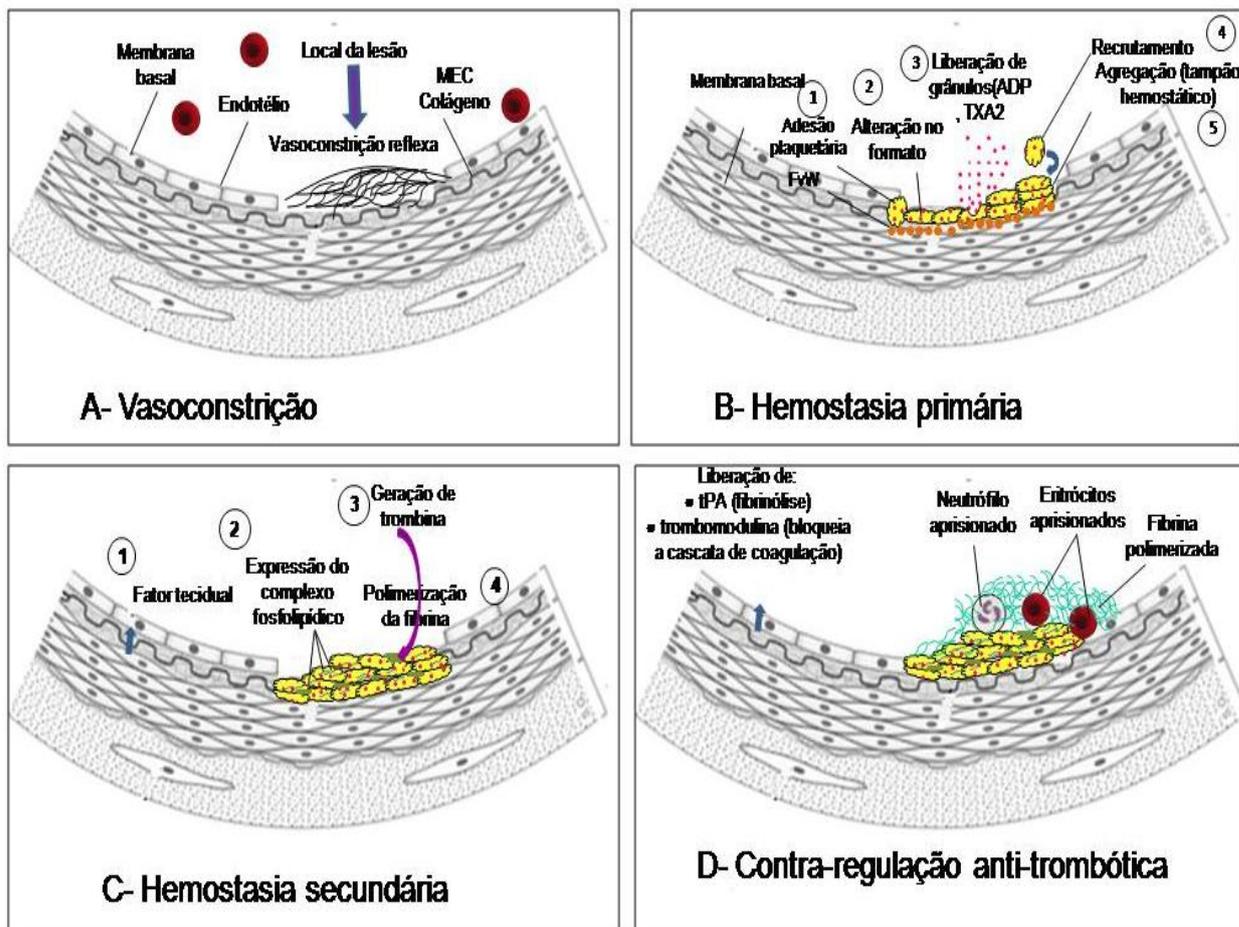


Figura 8- Hemostasia (a) Vasoconstrição local devido à lesão vascular. (b) Hemostasia primária: Ligação das plaquetas ao fator FvW, ativação (alteração no formato) e liberação de grânulos. (c) Hemostasia secundária: Ativação local da cascata de coagulação. (d) Mecanismo de contra-regulação: limitação do processo hemostático no local da lesão.

2.4.2 Trombose

A integridade do endotélio é essencial à regulação do tônus vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e à aterogênese (LIP *et al.*, 1999; BATLOUNI, 2001).

A trombose resulta da ativação patológica do processo normal de coagulação sanguínea (chamado de *tríade de Virchow*) (FIG.9), que pode ocorrer quando existe: (1) lesão endotelial, fator que sozinho pode iniciar a trombose; (2) alteração do fluxo sanguíneo e (3) hipercoagulabilidade do sangue (LIP *et al.*, 1999).

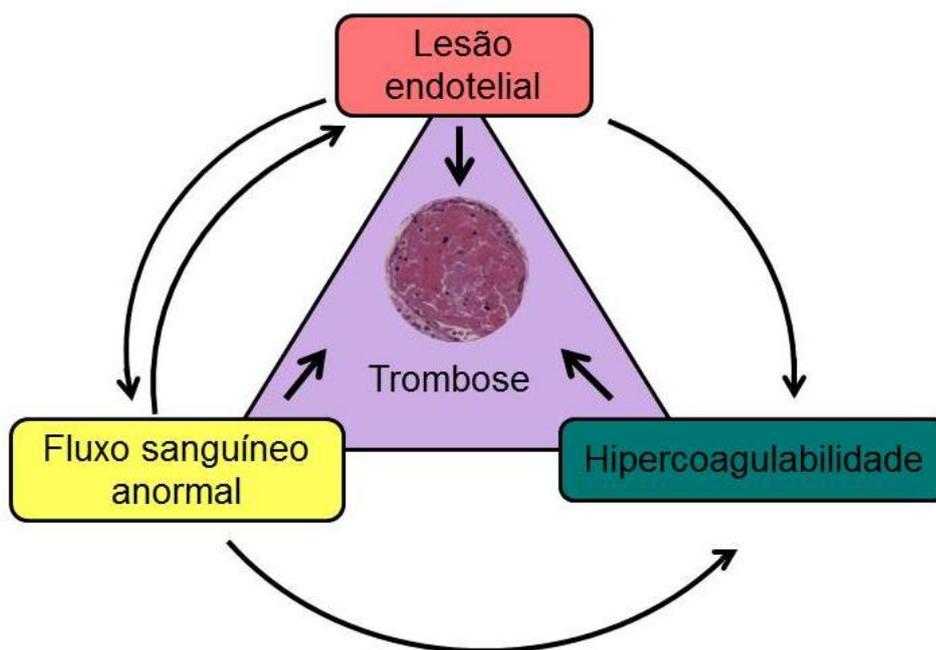


Figura 9- Tríade de Virchow – A integridade do endotélio é o fator mais importante. A lesão das células endoteliais também pode alterar o fluxo sanguíneo local e afetar a coagulabilidade. Por outro lado, o fluxo sanguíneo normal (estase ou turbulência) pode causar lesão endotelial. Os fatores podem atuar de forma independente ou se combinar para promover a formação do trombo. Adaptado de ROBBINS *et al.*, 2010.

Lesão ou perda endotelial ocorre em inúmeras circunstâncias, especialmente sobre placas ateromatosas, por agressão direta por bactérias ou por fungos, pela presença de leucócitos ativados em inflamação aguda, por invasão vascular por neoplasias malignas e por ação de toxinas de aranhas do gênero *Loxosceles* (XU *et al.*, PEREIRA *et al.*, 2009).

Quando processos patológicos alteram o mecanismo regulatório da hemostasia, excessiva quantidade de trombina se forma, iniciando a trombose (FIG. 10) (FURIE & FURIE, 2008).

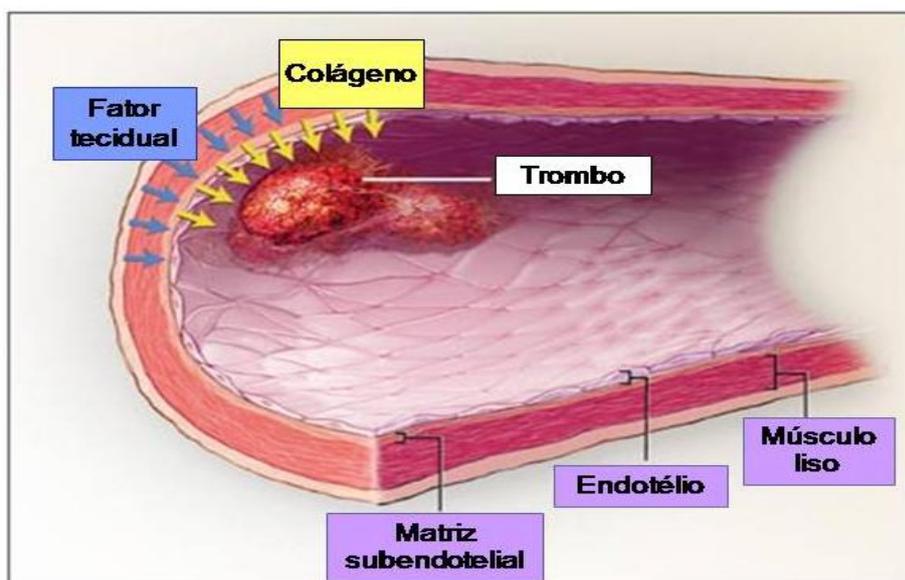


FIGURA 10 - Resposta à lesão vascular- Colágeno e fator tecidual associados à parede do vaso promovem uma barreira hemostática para a manutenção da alta pressão do sistema circulatório. Colágeno (setas amarelas), localizado na matriz subendotelial abaixo do endotélio e não exposto ao fluxo sanguíneo em condições normais. Fator tecidual (setas azuis), localizado nas camadas média (músculo liso) e adventícia da parede do vaso, entrando e, contato com o fluxo sanguíneo quando o vaso é lesado ou rompido. Ambos colágeno e trombina iniciam a formação do trombo – Adaptado de FURIE & FURIE (2008).

O endotélio contém três trombo-reguladores: óxido nítrico, prostaciclina e ectonucleotidase, que juntos fornecem uma defesa contra a formação do trombo. O colágeno da matriz subendotelial e o fator tecidual facilitam a manutenção de um sistema circulatório fechado (IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987).

Quando a parede do vaso é lesada ou o endotélio é rompido, a integridade da membrana endotelial é comprometida, por expor a matriz extracelular subjacente. Isso resulta no contato de componentes hemostáticos do sangue com substâncias pró-trombogênicas. Estes incluem o colágeno, o fator de von Willebrand (VWF) e a fibronectina (que ativa a cascata de coagulação) (FURIE & FURIE, 2008).

A exposição do colágeno desencadeia a ativação e o acúmulo de plaquetas, ao passo que o fator tecidual exposto inicia a geração de trombina, que não somente converte fibrinogênio em fibrina, mas também ativa plaquetas (FURIE & FURIE, 2008).

Estudos recentes relacionados com a patogenia da trombose mostram que pode haver duas vias distintas atuando em paralelo ou separadamente na ativação de plaquetas (DUBOIS *et al.*, 2006; MANGIN *et al.*, 2006; FURIE & FURIE, 2008). Em um desses caminhos, a exposição do colágeno subendotelial inicia a ativação de plaquetas, por outro lado, trombina – gerada pelo fator tecidual derivado da parede do vaso ou presente no fluxo sanguíneo – é o iniciador. Dependendo da lesão ou da doença, uma ou outra via pode predominar, mas a consequência da ativação de plaquetas por estas vias é a mesma.

Na via ativada por uma lesão endotelial ocorre a interação da glicoproteína VI (um receptor de colágeno nas plaquetas) com o colágeno exposto da parede do vaso da glicoproteína Ib-V-IX com o colágeno do fator von *willebrand* que resulta na ativação de plaquetas no sítio da lesão. A importância das glicoproteínas de plaquetas como a VI e a Ib-V-IX depende da taxa de cisalhamento da parede do vaso (RUGGERI *et al.*, 2000). Contudo, a interação do colágeno com a glicoproteína VI é requerida, como a glicoproteína Ib, um componente do complexo glicoproteína Ib-V-IX (MASBERG *et al.*, 2003; BERGMEIER *et al.*, 2006; DUBOIS *et al.*, 2006). A integrina $\alpha\beta 1$ e $\alpha\beta 2$ exerce um suporte, mas não é essencial na interação entre plaquetas e colágeno. A ativação por essa via iniciada pelo colágeno é independente de trombina.

A ativação do fator tecidual é uma segunda via que inicia a ativação plaquetária. A agregação plaquetária iniciada por esta via não requer ruptura no endotélio e é independente do fator *von Willebrand*.

2.5- Apoptose e alterações endoteliais no Loxoscelismo

Diversas evidências mostram que a apoptose de células endoteliais exerce um papel importante na biologia e patologia vascular. Em condições fisiológicas a apoptose pode ser detectada durante os processos de regressão dos arcos aórticos, aorta abdominal e ducto arterioso (FISHER *et al.*, 2000; AFFARA *et al.*, 2007). A apoptose também participa da regressão dos vasos, na angiogênese e formação do lúmen. Estudos demonstram que a incubação de células endoteliais com inibidores de caspases anti-apoptóticas ou a superexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl2 parece inibir a morfogênese *in vitro* (SEGURA *et al.*, 2002).

Adicionalmente Affara *et al.* (2007) demonstraram o papel da apoptose de células endoteliais na biologia vascular através de estudos conduzidos em camundongos com genes reguladores de apoptose inativados.

A apoptose de células endoteliais é associada com diversas alterações cardiovasculares, em particular a aterosclerose e a trombose (MEHTA *et al.*, 2002; NORATA *et al.*, 2002). Adicionalmente, pode promover uma importante etapa de transição na estabilização da placa aterosclerótica para uma placa com trombose. O ambiente tecidual da placa aterosclerótica pode promover a apoptose de células endoteliais. Por exemplo, o LDL oxidado (Ox-LDL) que está presente na maioria das placas ateroscleróticas regulando a expressão de proteínas anti-apoptóticas cFLIP e conseqüentemente a ativação do receptor de morte (Fas) de células endoteliais *in vitro*. Ox-LDL também parece ativar a liberação de fator indutor de apoptose (IAF) para a mitocôndria de células endoteliais da artéria coronária (AFFARA *et al.*, 2007)

A superexpressão de AIF usando oligonucleotídeo suprime a Ox-LDL induzindo a apoptose das células endoteliais (ZHANG *et al.*, 2004). Por outro lado a lipoproteína de alta densidade (HDL), que é antiaterogênica parece inibir a apoptose de células endoteliais por promover a atividade da sintetase de óxido nítrico (MINEO *et al.*, 2006). A apoptose das células endoteliais da placa aterosclerótica pode causar a exposição do colágeno subendotelial com subsequente trombose.

Estudos conduzidos por Durand *et al.* (2004) mostraram que a indução da apoptose de células endoteliais *in vivo*, por uma droga pró-apoptótica, a estaurosporina, promove tanto apoptose das células endoteliais quanto trombose. Além disso, a apoptose de células endoteliais se torna pró-coagulante por um processo que não requer a exposição do colágeno subendotelial (BOMBELI *et al.*, 1997). A cascata iniciada pelo fator tecidual pode promover um elo importante entre a apoptose e a trombose. A atividade do fator tecidual é aumentada pela exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície da célula endotelial durante a apoptose (TEDGUI & MALLAT, 2003).

Outras doenças como lúpus eritematoso sistêmico, vasculites (WOYWODT *et al.* 2003), rejeição de transplantes (KRUPNICK *et al.*, 2002; HALL & JEVNIKAR, 2003), apoptose de células associadas com desordens inflamatórias e alterações

não cardiovasculares como as neoplasias, têm sido associadas com a apoptose de células endoteliais (CARMELIET & JAIN, 2000).

A integridade dos vasos é essencial para a manutenção da fluidez do sangue, razão pela quais lesões estruturais ou funcionais do endotélio se associam muitas vezes à formação de trombos (LIP *et al.*, 1999).

A perda do revestimento endotelial permite contato direto do sangue com o conjuntivo subendotelial (ativação da via intrínseca), adesão e agregação plaquetária e redução dos fatores anticoagulantes. Outras vezes, não existe uma lesão morfológica no endotélio, mas apenas sua disfunção como ocorre no tabagismo (ZHANG *et al.*, 2006). Em todos esses casos, há redução na síntese de substâncias anticoagulantes e alteração da superfície celular, facilitando a adesão plaquetária (LIP *et al.*, 1999; FURIE & FURIE, 2008).

O veneno da *L. intermedia* apresenta efeito nocivo direto sobre o endotélio (VEIGA *et al.*, 2001a) e a membrana basal subendotelial, estrutura de extrema importância para a integridade dos vasos (ZANETTI *et al.*, 2002). Além disso, as células endoteliais são capazes de internalizar a toxina do veneno, via endocitose de fase fluida (NOWATZKI, 2009). A interação do veneno com o tecido implica em ativação do sistema do complemento, intensa migração de leucócitos polimorfonucleares, liberação de enzimas proteolíticas e de citocinas, agregação plaquetária e alterações na hemostasia (PATEL *et al.*, 1994; Da SILVA *et al.*, 2004; VAN DER BERG *et al.*, 2007).

VEIGA *et al.*, (2001a) observaram que esta ação direta do veneno altera a integridade vascular ao degradar o proteoglicano heparan sulfato, envolvido no processo de adesão celular e a entactina. Nowatzki (2009) demonstrou que o veneno de *L. intermedia* é capaz de interagir com a integrina $\alpha 5\beta 1$, receptor específico da fibronectina. Sabe-se que a matriz extracelular (MEC) influencia diversos mecanismos celulares, tais como: adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. Tais mecanismos são sinalizados através da interação de componentes da MEC com receptores celulares conhecidos como integrinas (SCHWARTZ, 2001; NOWATZKI, 2009).

VEIGA *et al.*, (2001a) relataram que a injeção intradérmica de 40 μg de veneno bruto de *L. intermedia* em coelhos induz a formação de “blebs” subendoteliais, vacúolos e degeneração da parede dos vasos após 4 horas. O

estudo da ação do veneno de *L. intermedia* sobre células endoteliais *in vitro* tem mostrado que a exposição ao mesmo induz perda de adesão das células ao substrato, degradação de componentes da matriz extracelular e a liberação de proteoglicanas da MEC e da superfície da célula para o meio de cultura (VEIGA *et al.*, 2001a).

Estudos de Veiga *et al* (2001a), demonstraram que as toxinas do veneno interagem tanto com a superfície das células endoteliais *in vitro*, quanto com a MEC. Estas toxinas degradam tanto a fibronectina exógena quanto a endógena (PALUDO, *et al.*,2006). Os resultados também demonstram que sob ação do veneno as células endoteliais sofrem retração do citoplasma, reorganização do citoesqueleto e redução da adesão célula-célula e célula - MEC (PALUDO *et al.*, 2006). Tais alterações morfológicas descritas por Veiga *et al.* (2001a) e Paludo *et al.* (2006) mostram claramente que o veneno de *L. intermedia* induz apoptose em células endoteliais de coelho, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Nowatzki (2009) estudou a ação do veneno de *L. intermedia in vitro* utilizando 40µg de veneno para verificar os efeitos citotóxicos do veneno loxoscélico após exposição prolongada e sua relação com o mecanismo de apoptose. Após 18 horas de injeção, Nowatzki (2009) verificou através de microscopia eletrônica de transmissão, que as células exibiam inúmeras projeções da membrana plasmática e condensação de cromatina. Essas alterações morfológicas características de apoptose foram confirmadas pelo aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax utilizando-se a técnica de *western blot*.

O desnudamento do endotélio pode ser causado por fluxo turbulento, espasmo vascular ou pelo aumento da apoptose das células endoteliais (XU *et al.*, 2009). Xu *et al.*, (2009) provaram que há uma forte relação entre apoptose endotelial, desnudamento do endotélio e trombose. Os mesmos autores mostraram que a descamação da placa ateromatosa via apoptose predispõe à trombose, consequência comum da aterosclerose. Adicionalmente, segundo Bombeli *et al.*, (1997) as células endoteliais apoptóticas se tornam pró-coagulantes pelo aumento da expressão de fosfatidilserina e pela perda de componentes anticoagulantes da membrana. Desta forma, as células endoteliais apoptóticas contribuem para o desenvolvimento de um estado pró-trombogênico (BOMBELI *et al.*, 1997). Os trombos observados no loxoscelismo são importantes para a indução da necrose

que culmina com a ulceração descrita nesta alteração. Porém ainda não se conhece ao certo o mecanismo que conduz às lesões do loxoscelismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a importância da apoptose na patogenia do loxoscelismo.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever histologicamente as lesões provocadas por *L. similis* em fragmentos de pele de coelhos.

- Avaliar morfometricamente o edema, a vasodilatação e o infiltrado inflamatório nos diferentes intervalos de tempo.

- Verificar a ocorrência de apoptose em células endoteliais da derme de coelho inoculada com veneno bruto de *L. similis*.

- Verificar se há aumento na expressão de *Bax* em células endoteliais após a injeção com o veneno de *L. similis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação pelo Comitê de ética em Experimentação Animal

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética (CETEA) cujo número de processo é 217/2007 aprovado em 09 de Abril de 2008.

4.2 Obtenção do Veneno

O veneno utilizado foi extraído segundo Silvestre *et. al.* (2005) e armazenado a -80°C .

4.3 Estudos *in vivo* em coelhos

Foram utilizados 40 coelhos *Oryctolagus cuniculus*, machos, da raça Nova Zelândia. Os coelhos foram criados e acompanhados até a atingir 3-4 Kg. Os mesmos ficaram alojados em gaiolas de arame galvanizado em um galpão da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa em Igarapé - MG (FIG. 11), onde recebiam ração comercial e água *ad libitum*.

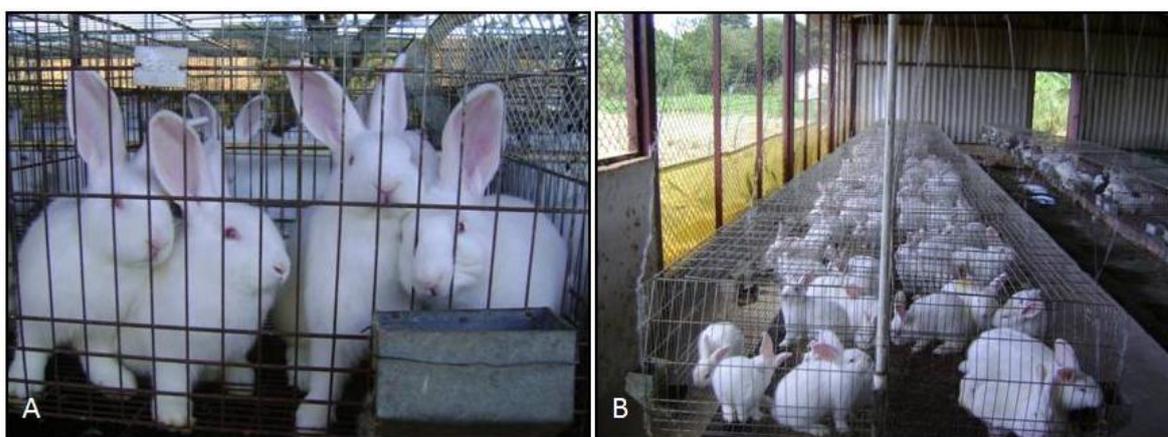


FIGURA 11 - Criatório da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa/UFMG - (A) coelhos com 60 dias de idade (B) galpão de alojamento dos coelhos.

Os coelhos foram previamente submetidos à tricotomia na região dorsal, próximo à escápula e, posteriormente, foram pesados e identificados.

Os 40 animais foram divididos da seguinte forma (FIG.12): (a) grupo controle - 4 grupos de 5 coelhos que receberam injeção intradérmica de 50 μ L de PBS e foram submetidos à eutanásia 2, 4, 6 e 8 horas após a injeção; (b) grupo tratado – 4 grupos de 5 coelhos cada, que receberam injeção intradérmica de 0,5 μ g de veneno bruto diluídos em 50 μ L de PBS e que foram submetidos à eutanásia 2, 4, 6 e 8 horas após a injeção.

Fragmentos de pele foram colhidos, fixados em formol tamponado a 10% para inclusão em parafina, em glutaraldeído 4% para inclusão em metacrilato e processados segundo técnica de rotina para embebição em parafina e inclusão em metacrilato. Os blocos de metacrilato e parafina foram seccionados a 3 e 4 μ m respectivamente. Os cortes de parafina foram corados em hematoxilina-eosina e os de metacrilato foram corados em ácido periódico de *Shiff* e azul de toluidina e examinados à microscopia de luz.

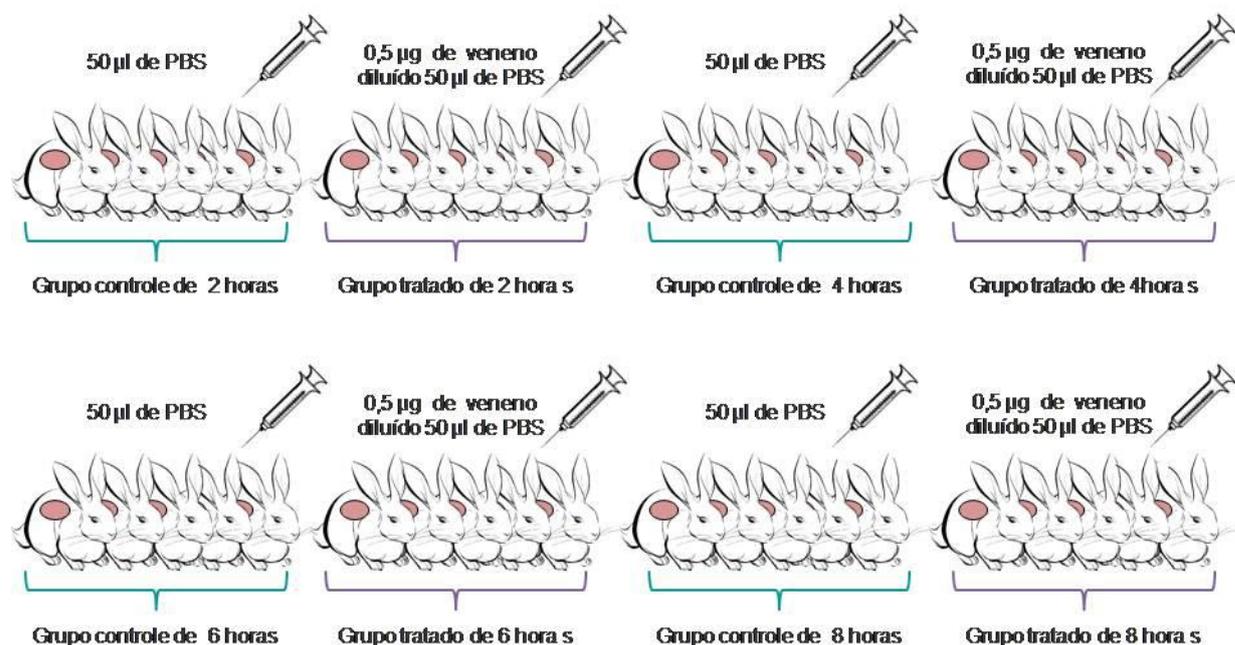


FIGURA 12: Representação esquemática do delineamento experimental

4.4 Inclusão em Metacrilato

Fragmentos de pele foram lavados em solução de PBS por 3 vezes, de 15 minutos cada. Posteriormente, foram fixados em paraformaldeído e desidratados em uma sequência crescente de alcoóis (70%,80%,90%,95% e 100%)por 40 minutos cada. Em seguida, foi realizada a fase de pré-infiltração usando-se resina: álcool na proporção de 1:1 por aproximadamente 30 minutos. O fragmento foi coberto até ficar submerso. Procedeu-se então a fase de infiltração, na qual a amostra foi incubada com resina nova (sem álcool) a 4°C por 12 horas.

A fase de inclusão foi feita utilizando resina nova e uma solução catalisadora sendo utilizadas 4 soluções: a primeira com 25ml de resina nova e 1ml da solução catalisadora; a segunda com 12,5 ml de resina nova e 0,5 ml de solução catalisadora; a terceira com 6,25 ml de resina nova e 0,25 ml de solução catalisadora e a última com 3,125 ml de resina nova e 0,125ml de solução catalisadora. Os fragmentos foram agitados por 15 minutos em agitador magnético. A seguir, as amostras foram colocadas em uma fôrma, acrescentou-se a solução endurecedora e envolveu-se a fôrma com plástico e papel alumínio. Após, no mínimo, três dias procedeu-se a microtomia.

4.5 Colorações em Metacrilato

4.5.1 Azul de toluidina

Os cortes de 3 µm foram transferidos para uma lâmina de vidro limpa contendo uma gota de água destilada. As lâminas foram secas em chapa quente a 58°C e os cortes foram cobertos com o corante azul de toluidina. As lâminas foram aquecidas novamente na placa aquecedora até que a borda da gota começasse a secar (tornar-se dourada). Posteriormente, foram lavadas em água, secas à temperatura ambiente e montadas.

4.5.2 Ácido periódico de Schiff

Secções de 3 µm de espessura de pele de coelho foram lavadas em água destilada por 5 minutos e, em seguida, cobertas em ácido periódico a 0,5 % por 20

minutos e lavadas em água destilada por 5 minutos. Posteriormente os cortes foram totalmente cobertos com reativo de *Schiff* por 60 minutos, lavados em 3 banhos de água sulfurosa por 3 minutos e em água corrente por 30 minutos. A contra-coloração foi feita com hematoxilina por 5 minutos com posterior lavagem em água corrente por 30 minutos. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e montadas com entelan.

4.6 Análise morfológica

Alterações histológicas como vasodilatação, edema e infiltrado inflamatório foram mensuradas morfometricamente.

4.6.1 Medida da espessura da pele

A espessura da pele foi mensurada a fim de se quantificar o edema observado histopatologicamente. Para tanto, lâminas de fragmentos de pele foram digitalizadas em microscópio estereoscópico em objetiva de 4x e telemétrica de 3.3, que resultou em um aumento final de 12x. A calibração, em milímetros, no programa Image Pro-plus foi feita digitalizando-se uma régua milimetrada. A mensuração dos fragmentos foi adaptada de Chorili *et al.* (2007). A medida da espessura da pele foi obtida através da distância entre a epiderme e a camada muscular. As medidas foram feitas em três pontos aleatórios de cada fragmento de pele.

4.6.2 Medida de vasos sanguíneos

A quantificação da vasodilatação foi feita medindo-se o diâmetro médio dos vasos sanguíneos, de secções de pele coradas em HE tanto dos animais tratados quanto dos controles. As imagens foram capturadas utilizando o microscópio Olympus BX-640 e digitalizadas através de uma câmera JVC TK-1270/JGB no aumento de 10x. As imagens foram transferidas para um analisador de imagens (Kontron Electronic, Carl Zeiss – KS300, versão 2), onde foram obtidas as medidas de diâmetro médio dos vasos em micrômetros. Foram utilizados 10 campos por animal tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, totalizando 50 campos por intervalo de tempo (2, 4, 6 e 8 horas) já que o “n” era de 5 animais por grupo.

4.6.3 Infiltrado Inflamatório

Para mensurar o infiltrado inflamatório, calculou-se o número mínimo de campos representativos microscópicos por amostra que foi determinado a partir de uma única lâmina na qual foi analisado e registrado o número de células inflamatórias por campo de acordo com Moro *et al.* (2003). As imagens foram capturadas utilizando-se a objetiva de 40x e secções coradas em HE. Foram calculados a média e os respectivos erros padrões e coeficientes de variação. O tamanho amostral considerado como número mínimo representativo foi de 25 campos, definido como aquele em que o acréscimo do nº de campos não resultou em redução considerável no valor do erro ou coeficiente de variação (Sampaio, 1998) (Gráf. 2).

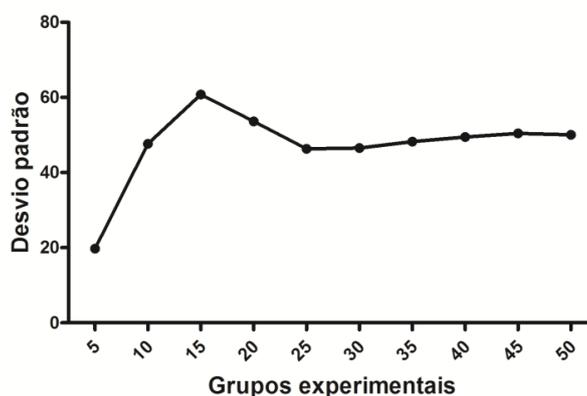


GRÁFICO 2: Número mínimo de campos representativos para a quantificação das células inflamatórias.

4.7 Marcação de heterófilos através da reação de imunoistoquímica

Os cortes de 5 μm , em lâminas previamente tratadas com solução de organossilano a 2%, foram desparafinados e hidratados pela passagem em xilol I e II, duas vezes por cinco minutos cada. Posteriormente passaram por um processo de hidratação nos álcoois 100%, 95%, 70%, cinco minutos cada. Em seguida os cortes foram tratados com solução de protease (0.5 U/mL durante 4 minutos). Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano para calprotectina à numa concentração de 1:250 à 37°C. A antígeno/anticorpo foi visualizada utilizando o kit universal de detecção de fosfatase alcalina “red” de

acordo com as instruções do fabricante. A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Harris (FALEIROS *et al.*, 2009).

4.8 Identificação *in situ* da fragmentação do DNA segundo a técnica de TUNEL (Marcação *in situ* da fragmentação do genoma com transferase terminal de deoxinucleotídeo)

A técnica foi realizada segundo GAVRIELI *et al.* (1992). Foi seguido o protocolo especificado pelo fabricante. O tempo de proteinase K era de 15 minutos a uma concentração de 2 mg/ml. As lâminas eram lavadas em salina tamponada TRIS – TBS 1X. Em seguida, a peroxidase endógena era inativada, cobrindo-se as secções com água oxigenada a 3% em metanol, por 5 minutos. As lâminas eram novamente lavadas em TBS 1X (20 mM de Tris pH 6, 140 mM de NaCl) e, logo após as secções eram cobertas com tampão de equilíbrio por cerca de 10 a 30 minutos, à temperatura ambiente. A secção era então coberta com a enzima TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeo) e deoxinucleotídeos. As lâminas eram colocadas em câmara úmida a 37° C por 1,5 h. Posteriormente, as lâminas eram lavadas em TBS 1X e cobertas com tampão de parada (0,5M de EDTA, pH 8), onde permaneciam por 5 minutos. As secções eram lavadas em TBS 1X e, logo após, cobertas com o tampão de bloqueio e incubadas por 10 minutos. Os cortes foram então tratados com um conjugado de peroxidase strepto-avidina diluído em tampão de bloqueio. A incubação era feita em câmara umidificada por 30 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas eram lavadas em TBS 1X e as secções cobertas com diaminobenzidina – DAB por 10-15 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas eram lavadas em água destilada e contra-coradas com 0,3% de verde de metila por 10 minutos, à temperatura ambiente. O excesso de corante era absorvido com toalha de papel e as lâminas eram imersas 2-4 vezes em etanol absoluto. Em seguida, repetiu-se esta etapa com etanol absoluto fresco. As lâminas eram então imersas em xilol e montadas.

Além da marcação específica (grumos amarronzados, revelados pela DAB), foram consideradas características morfológicas de apoptose o enrugamento celular com projeções digitiformes da membrana e formação de corpos apoptóticos

e fragmentação da membrana nuclear e a compactação da cromatina em massas densas uniformes alinhadas no lado interno da membrana nuclear.

4.9 Reações de imunoistoquímica para Bax

Secções de pele de coelho eram desparafinadas em estufa a 58°C e posteriormente submersas em Xilol I e II por 20 minutos. Posteriormente as lâminas eram mergulhadas 10 vezes em cada um dos álcoois: absoluto I e II, 90%, 80%, 70% e lavadas em solução salina de TBS por 5 minutos. Em seguida era realizada a recuperação antigênica com solução de tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos em banho-maria à temperatura de 93°C. Após atingirem a temperatura ambiente, as lâminas eram lavadas em água destilada. Posteriormente, era realizado o bloqueio da peroxidase endógena pingando-se uma gota do reagente *peroxidase block* sobre os cortes e incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as secções de pele eram lavadas em água destilada e em solução tampão de lavagem por 5 minutos à 25° C e os cortes eram secos, cobertos e incubados com o anticorpo primário por 12 horas em câmara úmida a 25° C. Posteriormente, eram feitas duas lavagens em solução tampão por 5 minutos cada, as secções eram secas ao redor e o complexo estreptavidina–peroxidase era aplicado e incubado em câmara úmida por 30 minutos à 25° C. Em seguida, as secções eram lavadas duas vezes em tampão e secas ao redor e aplicava-se o DAB (diaminobenzidina) sobre os mesmos e incubava-se por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas eram então lavadas em água corrente e destilada e contra-coradas com hematoxilina, seguida de uma lavagem em água amoniacal a 1%. Finalmente, as lâminas eram desidratadas e montadas permanentemente. O anticorpo primário utilizados foi: anticorpo monoclonal produzido em camundongo para Bax clone 2D2 (Invitrogen). O kit utilizado foi o Dako ARK (*Animal Research Kit, peroxidase*). A diluição utilizada de cada anticorpo era de 1: 200.

4.10 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão ou mediana, conforme tenham apresentado uma distribuição normal ou não, pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Quando a distribuição era normal utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para avaliar eventuais diferenças entre os parâmetros mensurados nos diferentes tempos de injeção do veneno em relação aos grupos controles e aplicou-se o teste de *Newnam Keuls* para comparar os grupos entre si. Quando a distribuição dos dados não demonstrava normalidade, o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi aplicado e o pós-teste de *Dunn's* utilizado para múltipla comparação. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 5.

5 RESULTADOS

5.1 Estudos *in vivo* em coelhos

5.1.1 Análise Macroscópica

Macroscopicamente foi possível observar na pele dos coelhos injetados com 50 μ L (0,5 μ g) de veneno de *Loxosceles similis*, uma lesão que se difundiu radialmente com o passar do tempo. Além disso, a área onde o veneno foi injetado ficou arroxeadada, edemaciada e sensível ao toque (FIG. 2) em todos os intervalos de tempo. A injeção de 0,5 μ g de veneno bruto foi o suficiente para atingir a musculatura (FIG. 13).

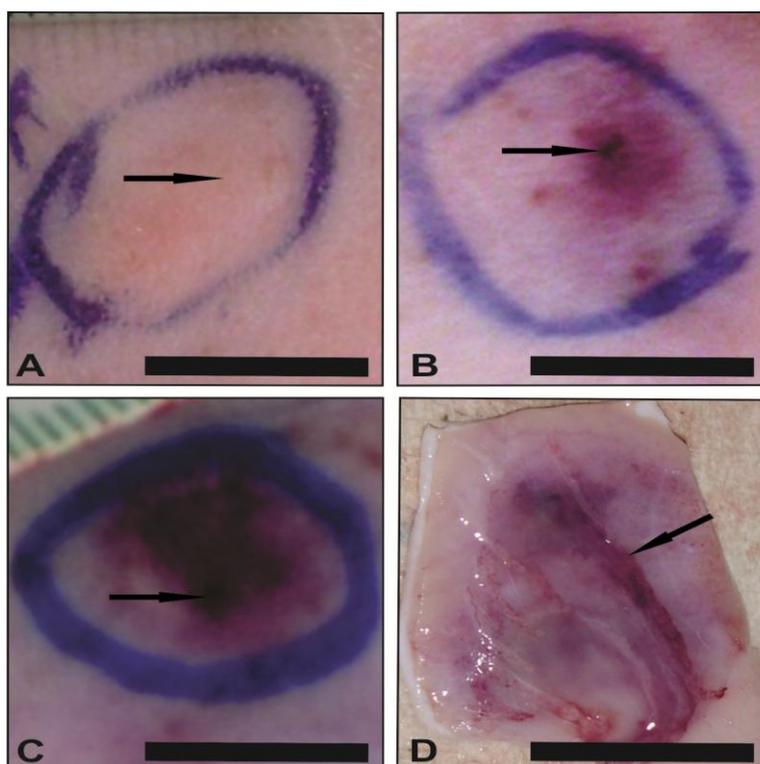


FIGURA 13 -Pele de coelho: (A) Grupo controle- notar o local da injeção de 50 μ L de PBS (seta branca), (B) Grupo tratado –notar a área arroxeadada tanto no local de injeção (seta preta) quanto radialmente (seta preta), 2 horas após a injeção de 0,5 μ g de veneno bruto de *L. similis*, (C) Grupo tratado 8 horas após a injeção de 0,5 μ g de veneno bruto de *L. similis*, observe como o veneno (ver local de injeção- seta branca) se difunde radialmente (setas pretas) por uma área maior; (D) Grupo tratado 8

após a injeção de 0,5 µg de veneno bruto de *L. similis*, observe o edema (seta branca) e a hemorragia (seta preta) presentes na hipoderme. Barra = 1 cm.

5.1.2 Análises Microscópicas

Nos fragmentos de pele de coelho injetados com 0,5 µg de veneno de *L. similis* nos intervalos de tempo 2, 4, 6 e 8 horas observou-se dissociação de fibras e células em todas as camadas dérmicas (superficial, média e profunda) caracterizando edema (FIG. 14). Adicionalmente, na pele dos animais tratados havia angiectasia, hiperemia e hemorragia (FIG.15), constatou-se também a presença de trombos ocludentes e semiocludentes nos plexos superficial, médio e profundo (FIG. 16). Pôde-se também observar deposição de fibrina (Fig. 17). Em todos os intervalos de tempo, a derme apresentou infiltrado inflamatório principalmente heterofílico, particularmente nas dermes média e profunda, cuja intensidade aumentou segundo o intervalo de tempo de injeção (FIG. 18). Tal infiltrado se disseminava pela camada muscular, sendo acompanhado de necrose da musculatura, a qual era evidenciada após 6 horas de injeção (FIG. 19). Quanto à distribuição, o infiltrado era difuso em todas as camadas dérmicas, apresentando-se nodular em alguns pontos, quando o intervalo de injeção era superior a 6 horas. Nestes casos, observava-se também a formação de manguitos perivasculares que se infiltravam pelas paredes dos vasos, caracterizando vasculite (FIG. 20). Em alguns vasos, notou-se completa destruição de suas paredes. O infiltrado inflamatório foi também observado ao redor de alguns folículos pilosos e músculos eretores dos pêlos. Após 6 horas de injeção notou-se presença de degeneração fibrinóide em algumas paredes vasculares e degeneração hialina de fibras colágenas. O processo inflamatório foi caracterizado como dermatite aguda multifocal fibrinohemorrágica.

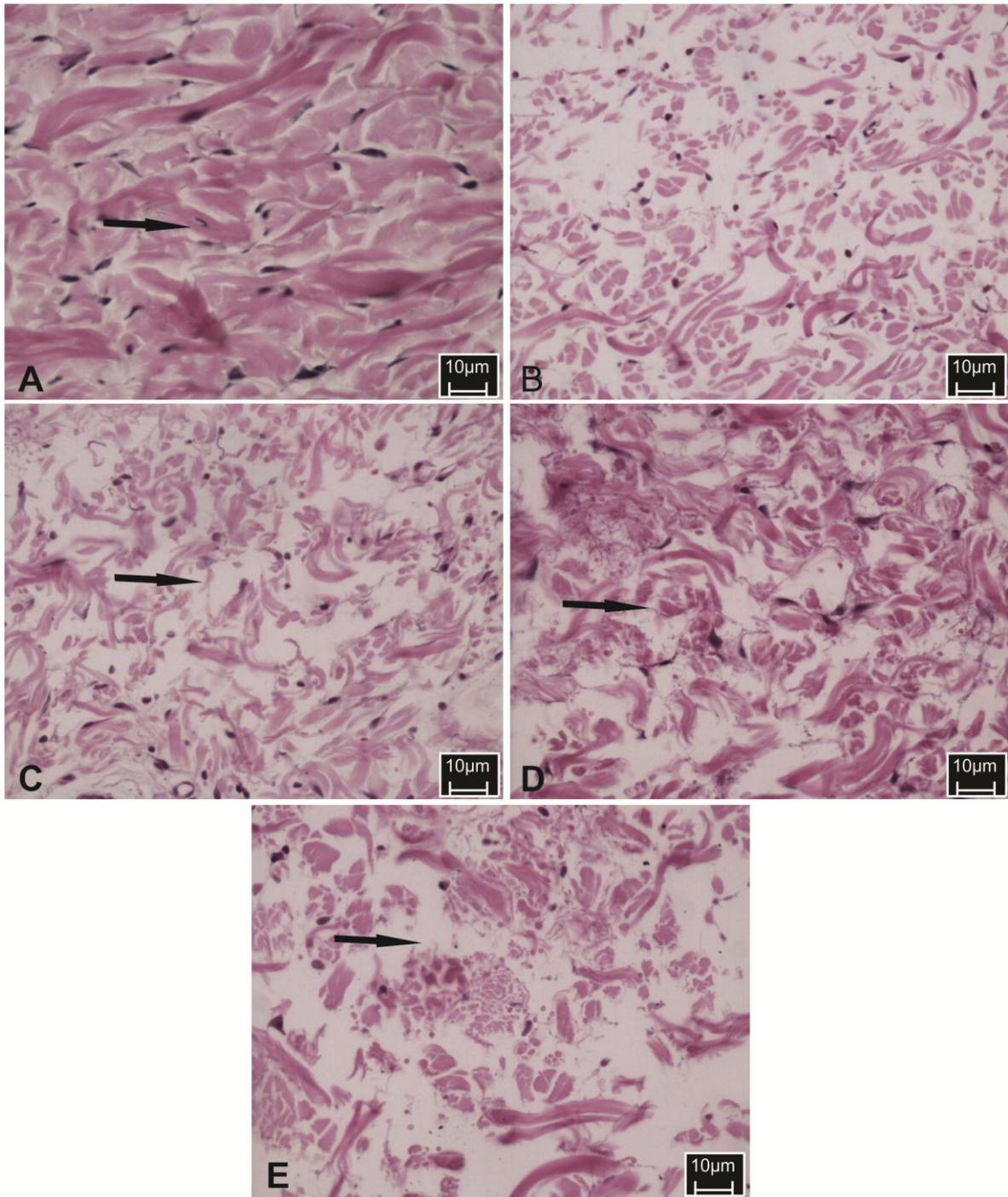


FIGURA 14 - Pele de coelho: (A) grupo controle - seta preta indicando integridade das fibras colágenas; grupo tratado (B) 2h, (C) 4h, (D) 6h e 8 h (E) após a injeção de 0,5 µg de veneno de *Loxosceles similis* – observar a dissociação de fibras e células caracterizando o edema (setas pretas); Coloração: HE; Barra=10 µm.

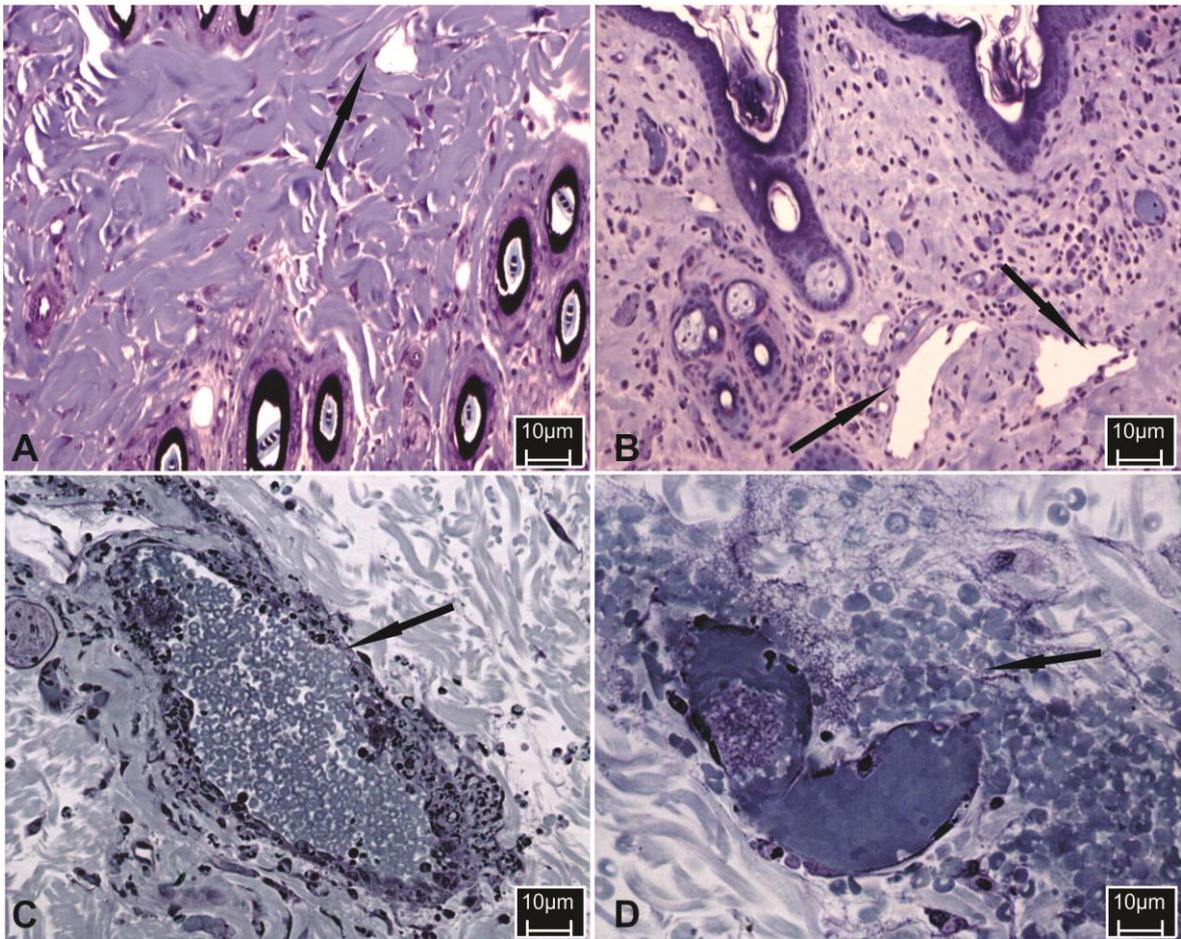


FIGURA 15 - Pele de coelho: (A) grupo controle - seta preta indicando vaso normal; (B) grupo tratado- setas indicando angiectasia, (C) hiperemia (seta) e (D) hemorragia (seta); Coloração Azul de Toluidina; Barra=10 µm.

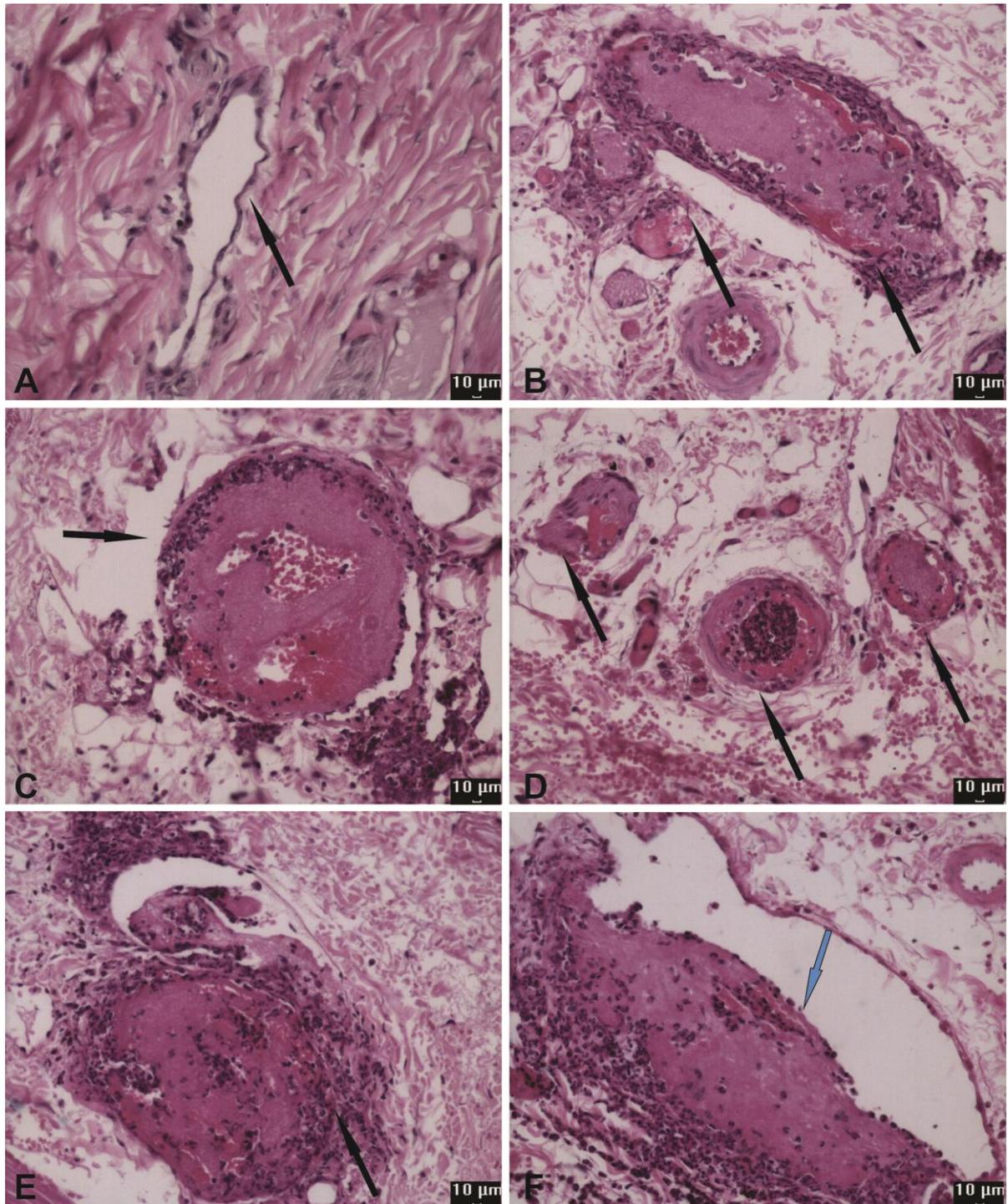


FIGURA 16 - Pele de coelho. (A) Grupo controle- vaso sanguíneo sem trombo (seta preta); Grupo tratado- vasos sanguíneos contendo trombos oclusivos em todos os intervalos de tempo: (B) 2 h, (C) 4 h, (D) 6 h e (E) 8 horas após a injeção de 0,5 µg de *Loxosceles similis* (setas pretas); (F) trombo semi-ocludente 2 horas após injeção do veneno (seta azul). Coloração HE, Barra=10 µm.

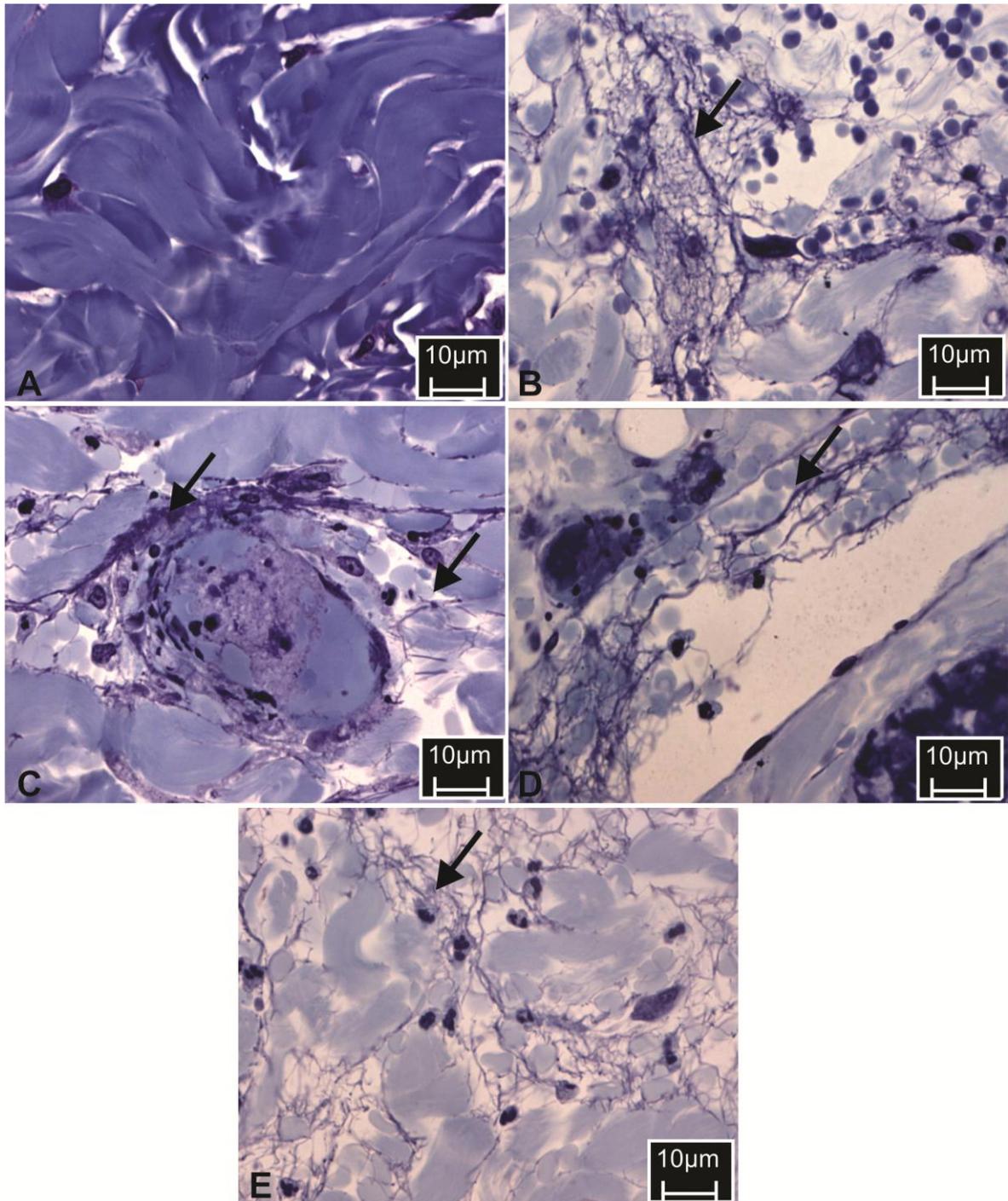


FIGURA 17 - Pele de coelho (A) grupo controle - derme preservada, ausência de fibrina; Setas indicando deposição de fibrina em intervalos de 2 h (B), 4 h (C), 6 h (D) e 8 h (E) após a injeção. Inclusão em metacrilato e coloração em azul de toluidina; Barra=10 µm.

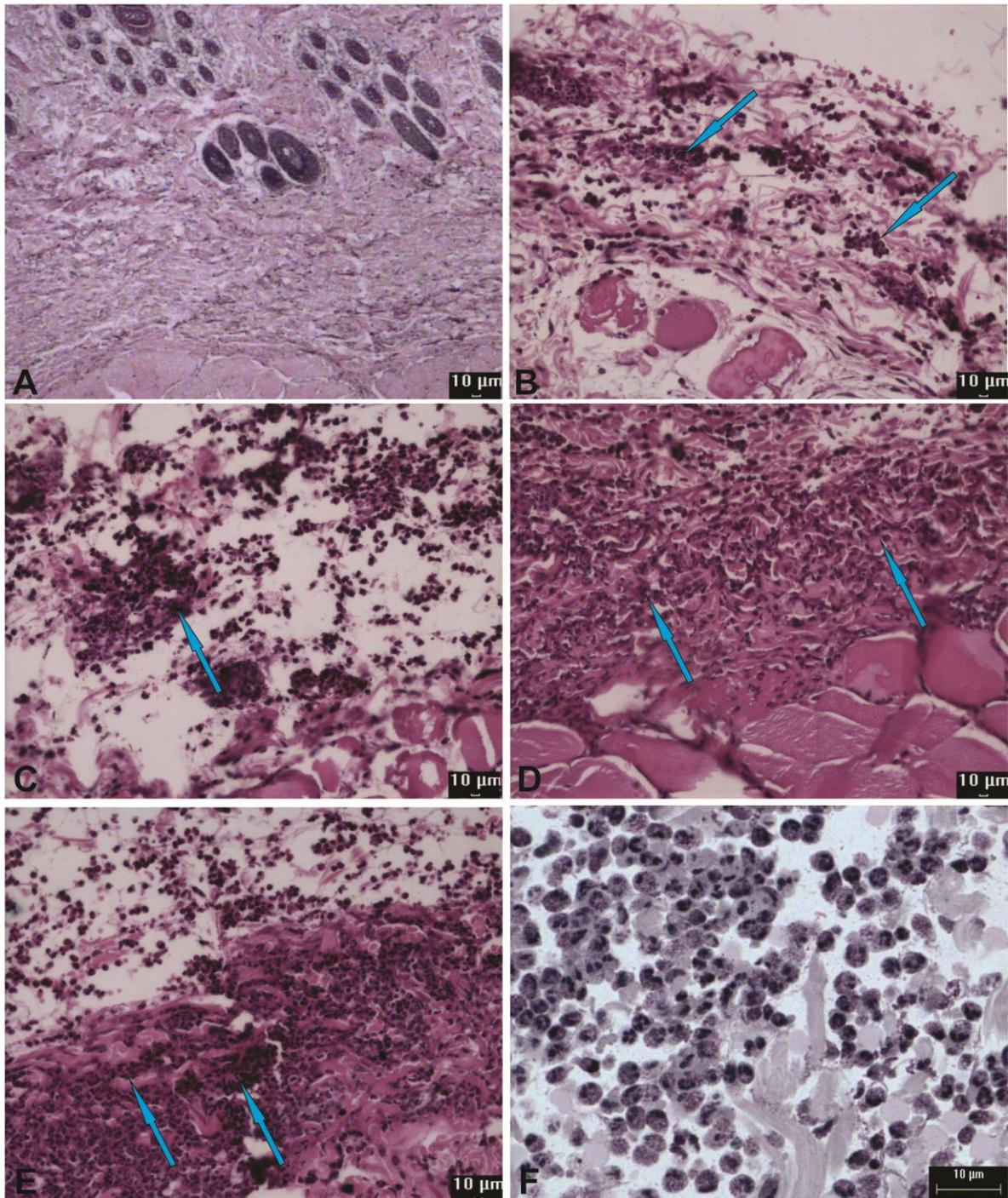


FIGURA 18 - Pele de coelho: (A) grupo controle - ausência de infiltrado inflamatório entre as fibras colágenas; grupo tratado - infiltrado inflamatório predominantemente heterofílico (setas azuis) nos diferentes intervalos de tempo: (B) 2 h, (C) 4 h, (D) 6 h e (E) 8 horas após a injeção de 0,5 µg de veneno de *Loxosceles similis*; (F) detalhes do infiltrado inflamatório. (metacrilato, corte semi-fino (coloração HE); Barra=10 µm.

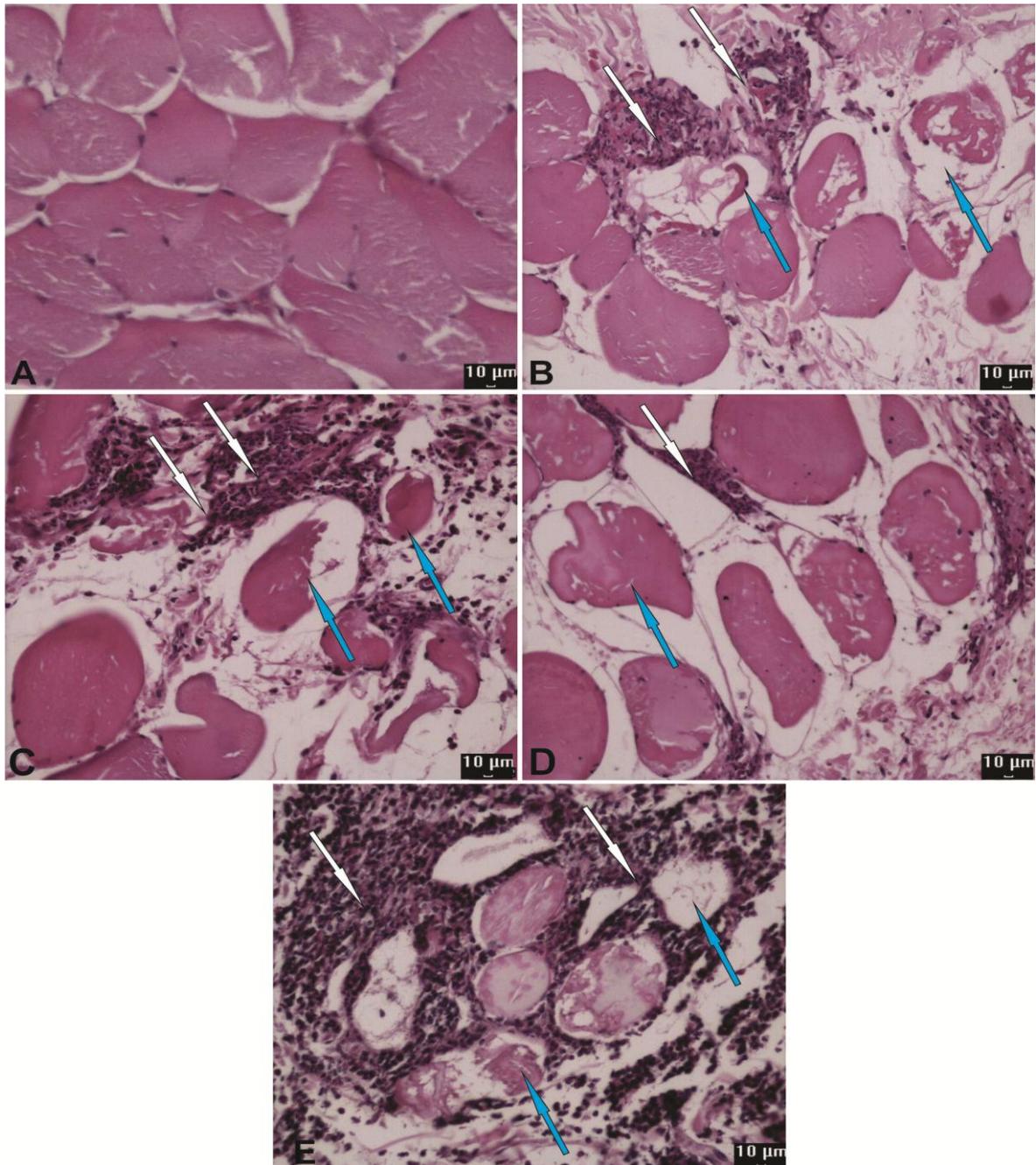


FIGURA 19- Pele de coelho: (A) Grupo controle – músculo cutâneo íntegro e ausência de infiltrado inflamatório; grupo tratado – necrose do músculo cutâneo (setas azuis) e infiltração heterofílica (setas brancas) após 2 horas (B), 4 horas (C).6 horas (D) e 8 horas (E) de injeção de 0,5 µg de veneno de *Loxosceles similis*. Coloração: HE; Barra=10 µm.

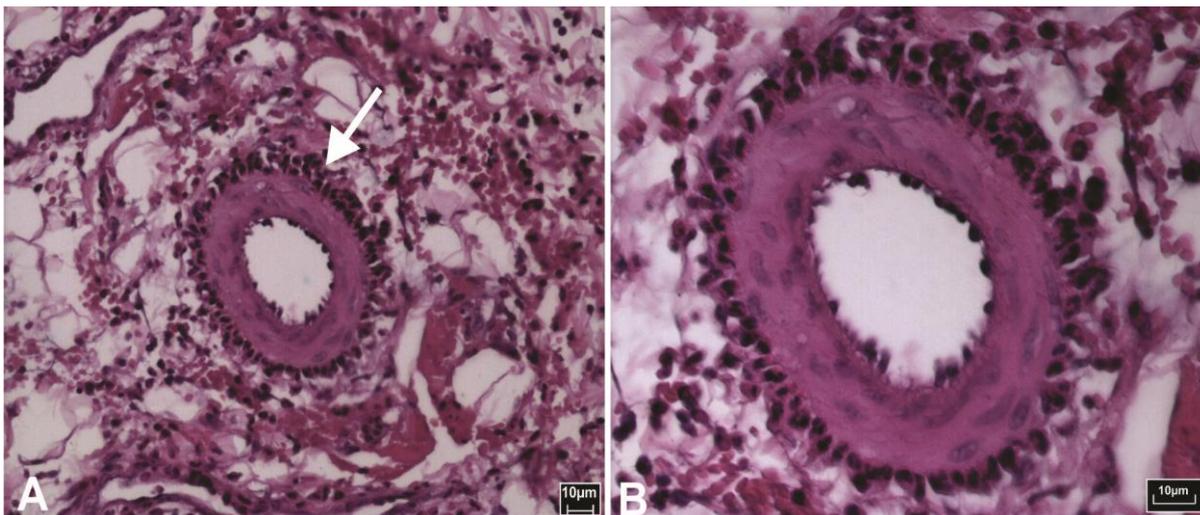


FIGURA 20 - Pele de coelhos: (A) infiltrado perivascular heterofílico caracterizando perivasculite (seta branca), (B) detalhe do manguito perivascular 6 horas após injeção de veneno. Coloração: HE; Barra=10 µm.

5.2 Análise morfométrica

5.2.1 Mensuração da espessura da pele

Para a avaliação e quantificação do edema provocado pela ação do veneno de *L. similis* em coelhos, foram medidas a espessura da pele dos coelhos (em µm) em três pontos aleatórios de cada animal que foram posteriormente comparadas com as medidas de espessura da pele do grupo controle (animais que receberam intradermicamente apenas PBS). As médias de espessura da pele dos animais injetados com veneno de *L. similis* foram: 4.54 ± 0.15 µm; 4.75 ± 0.21 µm; 5.08 ± 0.27 µm e 5.10 ± 0.28 para os intervalos de 2, 4, 6 e 8 horas respectivamente. Já as médias dos animais controles foram de 3.45 ± 0.12 ; 3.50 ± 0.20 ; 3.38 ± 0.17 e 2.85 ± 0.10 µm para os intervalos de 2,4, 6 e 8 horas respectivamente (GRÁF. 2). A diferença entre os grupos controles e tratados foi significativa em todos os intervalos de tempo ($P < 0.0001$), pelos testes ANOVA e *Newman-Keuls*. Não houve diferença significativa entre os grupos controles e entre os grupos tratados com veneno.

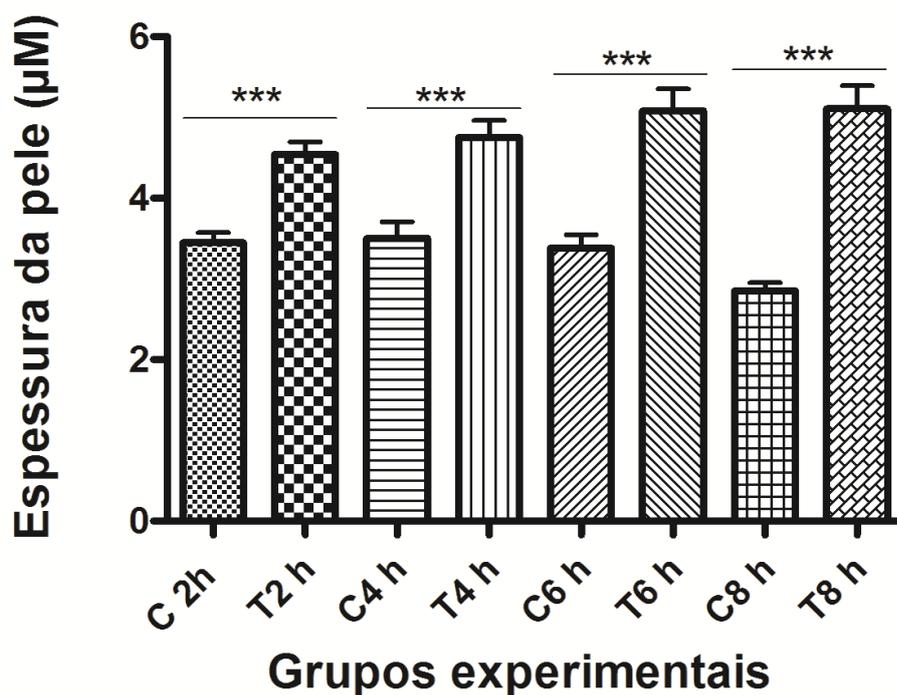


GRÁFICO 3- Mensuração da espessura da pele dos coelhos (μm) para quantificação do edema. Diferença estatística significativa ($P < 0.0001^{***}$), entre grupos tratados e controles em todos os intervalos de tempo pelos testes ANOVA e *Newman-Keuls*.

5.2.2 Mensuração dos vasos sanguíneos

Para a comprovação morfométrica da angiectasia dos vasos sanguíneos foram feitas medidas do diâmetro médio dos vasos. Os dados mostraram que o diâmetro médio dos vasos sanguíneos foi de $91.91 \pm 5.89 \mu\text{m}$, $101.7 \pm 8.90 \mu\text{m}$, $109.80 \pm 10.2 \mu\text{m}$ e $109.90 \pm 9.42 \mu\text{m}$ para os intervalos de 2, 4, 6 e 8 horas respectivamente, dos animais injetados com veneno. Os animais controles apresentaram diâmetro médio de $50.97 \pm 5.7 \mu\text{m}$, $55.73 \pm 6.4 \mu\text{m}$, $57.61 \pm 5.53 \mu\text{m}$ e $55.94 \pm 5.45 \mu\text{m}$ para os intervalos de 2, 4, 6 e 8 horas de injeção de PBS (Gráf. 3). A diferença entre os grupos controles e tratados foi significativa em todos os intervalos de tempo ($P < 0.0001$) pelos testes *Kruskal-Wallis* e *Dunn's*.

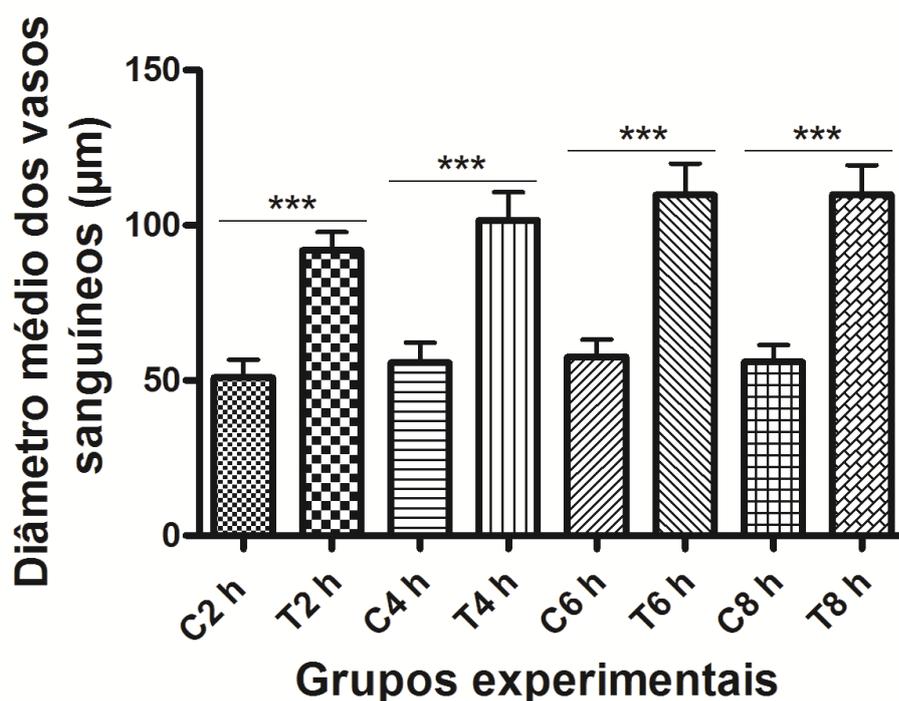


GRÁFICO 04- Mensuração do diâmetro médio dos vasos sanguíneos. Diferença estatística significativa entre os grupos tratados (T2h, T4h, T6h e T8h) e controles, pelo teste *Kruskal-Wallis*, *** $P < 0,001$.

5.2.3 Quantificação do infiltrado inflamatório e análise estatística

A morfometria do infiltrado inflamatório mostrou médias de $28,61 \pm 1,79$ (2h), $50,12 \pm 1,63$ (4h), $64,75 \pm 1,82$ (6h) e $105,2 \pm 1,53$ (8h) após a injeção do veneno de *L. similis*. Já os animais controles apresentaram nos respectivos intervalos de tempo médias de: $0,77 \pm 0,14$ (2h), $2,5 \pm 0,59$ (4h), $1,67 \pm 0,56$ (6h) e $2,85 \pm 0,89$ (8h) (GRÁF. 4). A diferença entre os grupos controles e tratados foi significativa em todos os intervalos de tempo ($P < 0,0001$), pelos testes *Kruskal-Wallis* e *Dunn's*.

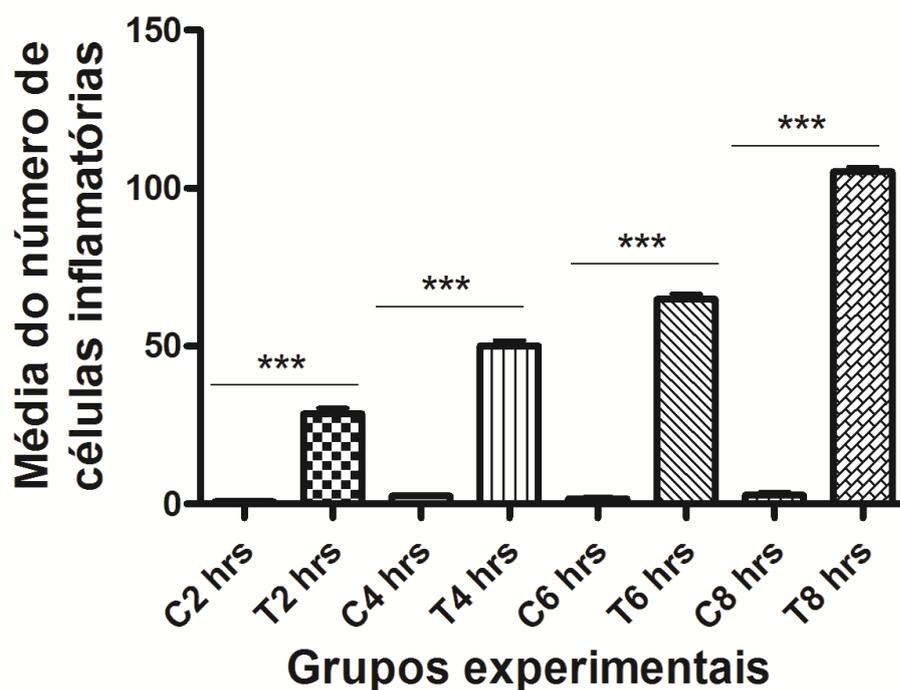


Gráfico 05: Análise quantitativa da dinâmica do número de células do infiltrado inflamatório nos diferentes intervalos de tempo (2, 4, 6 e 8) horas após injeção do veneno. Diferença estatística significativa entre os grupos tratados e controles a partir de 2h de injeção, pelo teste *Kruskal-Wallis* e *Dunn's*, *** $P < 0,001$.

5.3 Apoptose no Endotélio

A partir de 2 horas de injeção do veneno, observou-se, em alguns vasos, a presença de células endoteliais contraídas, apresentando perda de adesão entre si e com a MEC (anoiquia), contendo núcleo retraído, carioteca irregular e cromatina condensada, caracterizando apoptose (FIG. 21). Adicionalmente, células endoteliais em apoptose estavam presentes na interface trombo-vaso a partir de 2 horas de injeção (FIG. 22)

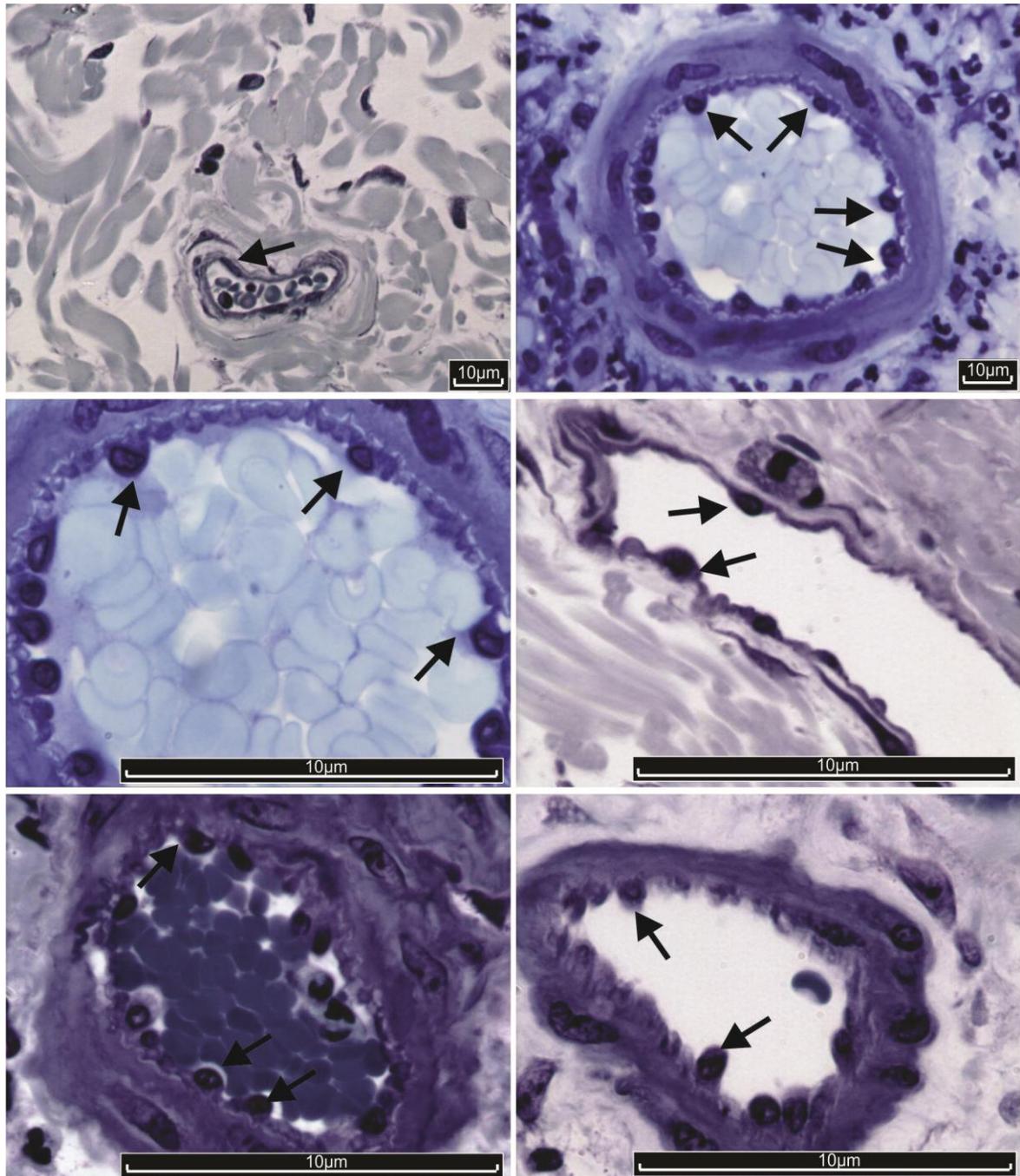


FIGURA 21 -Pele de coelho: (A) grupo controle- vaso sanguíneo- célula endotelial (seta preta); Grupo tratado- células endoteliais em apoptose (setas pretas indicando as células endoteliais perdendo a adesão com a parede do vaso e a condensação de cromatina): (B) e (C) - ver detalhes 2 h, (D) 4 h, (E) 6 h e (F) 8 horas após a injeção de 0,5 µg de *Loxosceles similis*, Coloração: azul de toluidina (cortes semi-finos), Barra=10 µm.

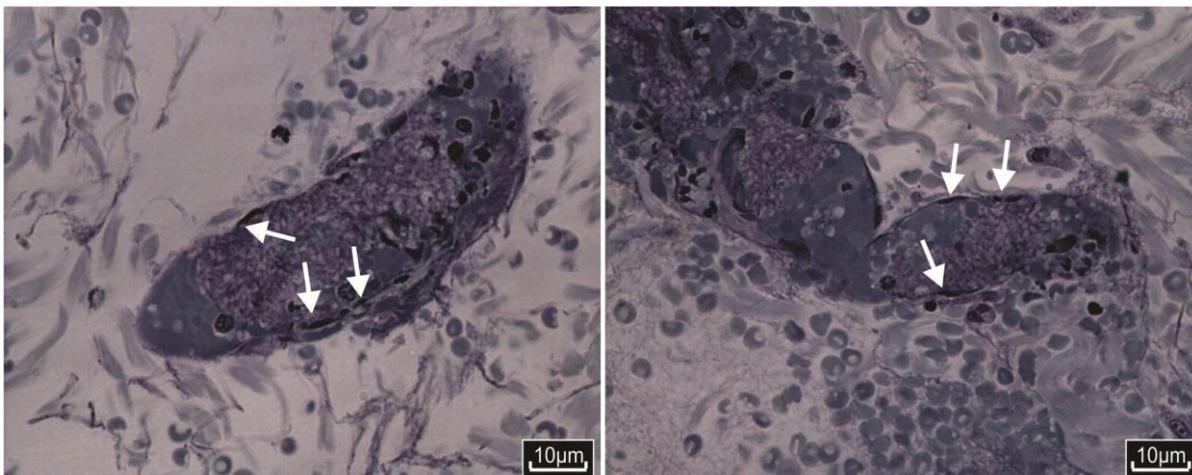


FIGURA 22 – Pele de coelho: (A) e (B) apoptose de células endoteliais na interface trombo-vaso (setas) 2 horas após a injeção de 0,5 µg de *Loxosceles similis*. Coloração: azul de toluidina (cortes semi-finos), Barra=10 µm.

5.4 Marcação de heterófilos através da reação de imunoistoquímica

Através de seções de pele de coelhos injetados com veneno de *L. similis* submetidas às reações de imunoistoquímica para proteínas do citosol verificou-se o predomínio de heterófilos (FIG. 23).

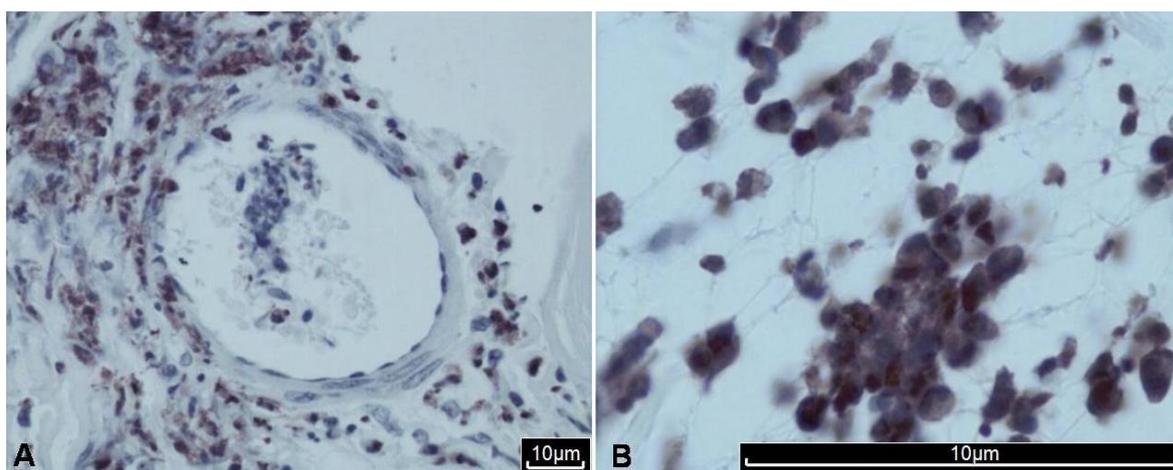


FIGURA 23 - Marcação de heterófilos via reação de imunoistoquímica para calprotectina. (A) Marcação positiva dos heterófilos em vermelho e (b) Infiltrado inflamatório heterofílico; Contra-coloração com hematoxilina. Barra=10 µm.

5.5 Identificação *in situ* da fragmentação do DNA segundo a técnica de TUNEL (Marcação *in situ* da fragmentação do genoma com transferase terminal de deoxinucleotídeo)

No local da lesão provocada pela injeção de 0,5 µg de veneno de *L. similis*, observaram-se células endoteliais marcadas positivamente pela reação de TUNEL. Na pele dos animais controles o mesmo não foi constatado. Adicionalmente, havia células endoteliais com marcação positiva na interface trombo-vaso (FIG. 24 e 25).

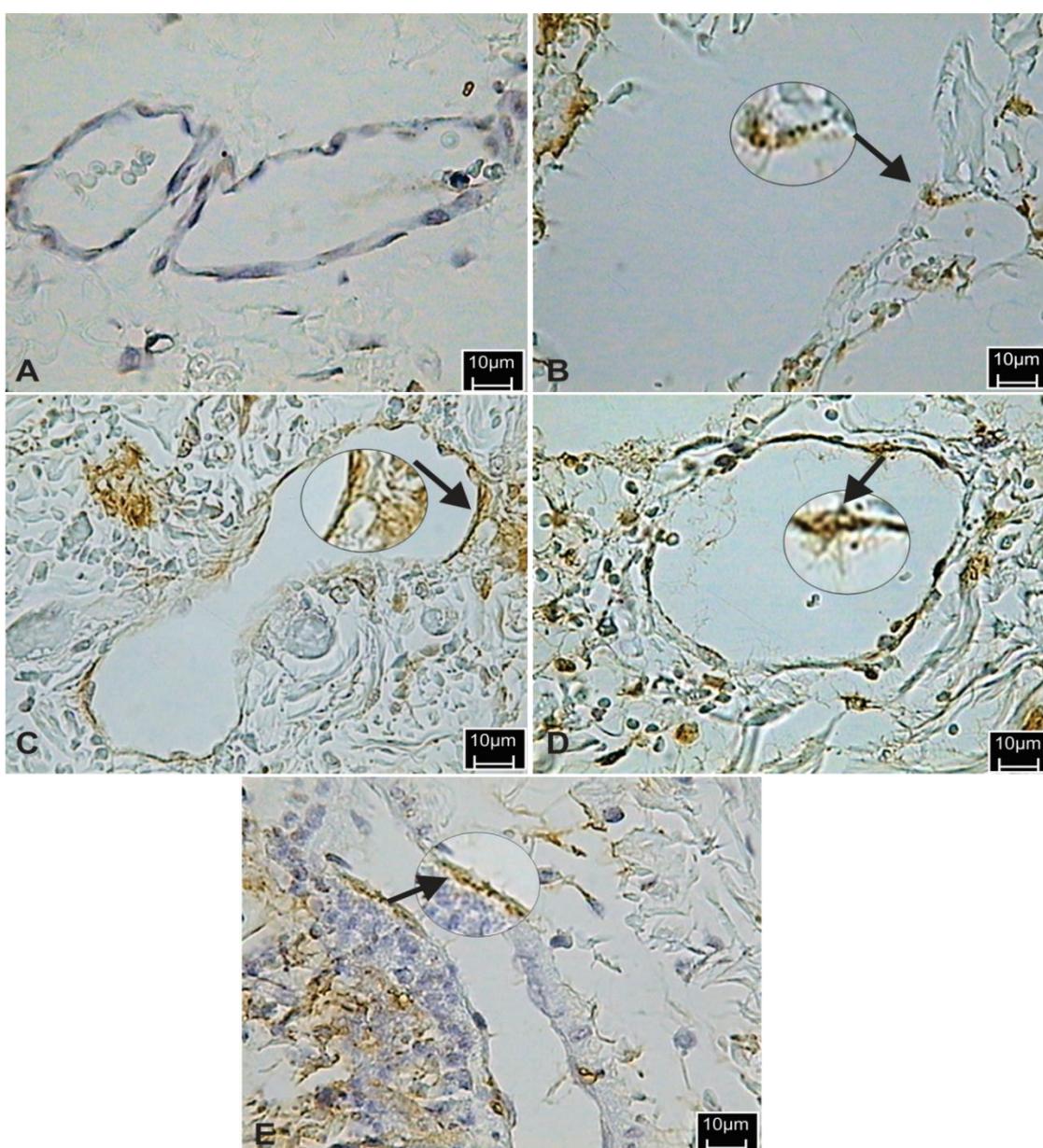


FIGURA 24 - Pele de coelho (A) controle (B), (C), (D) e (E) tratado com 0,5 µg de veneno de *L. similis* a partir de 2 horas de injeção de veneno, setas

indicando células endoteliais marcadas positivamente para as reações de TUNEL. Contra coloração com hematoxilina. Barra= 10 μ m

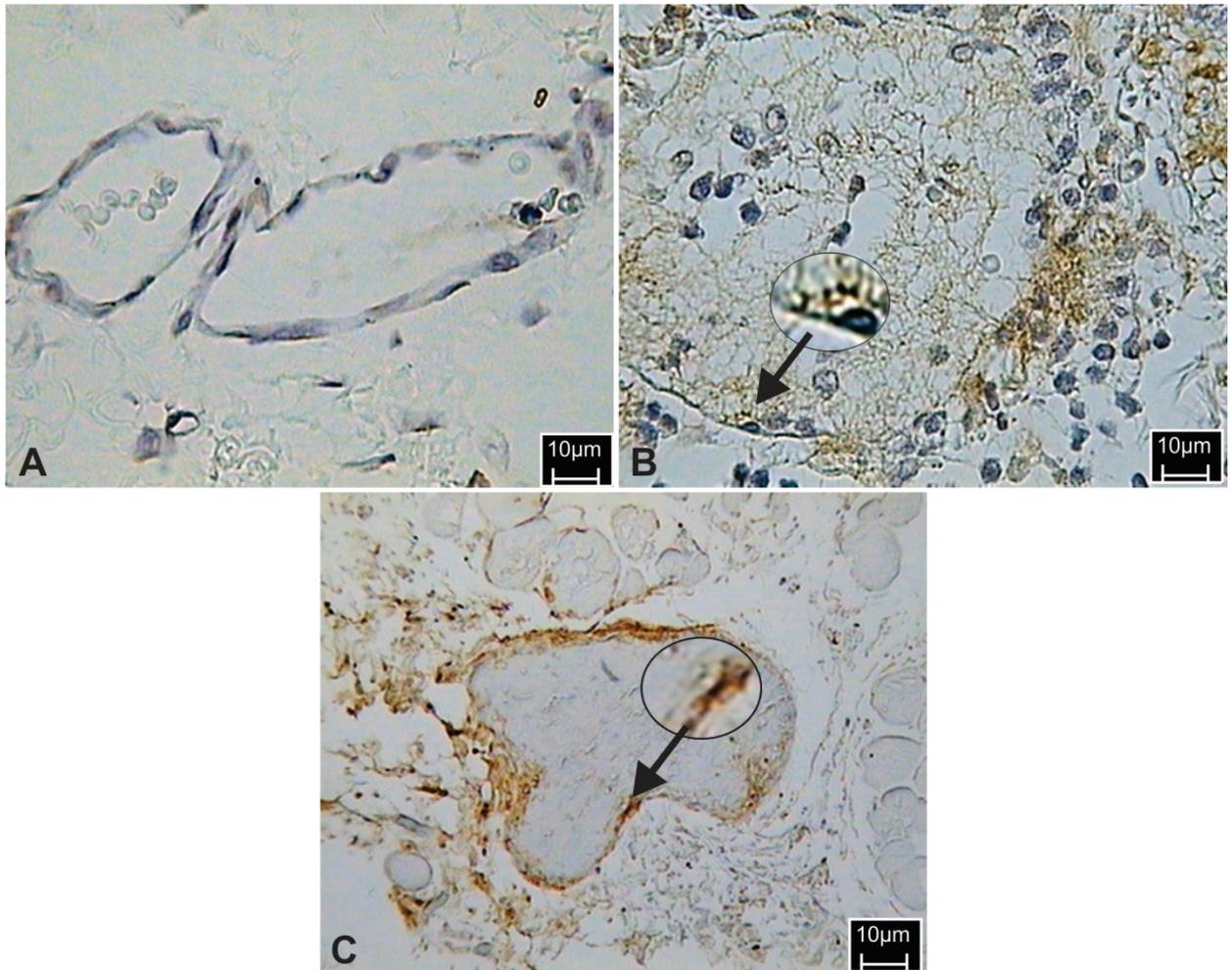


FIGURA 25- Pele de coelho (A) grupo controle; (B) e (C) grupo tratado 4 horas após injeção do veneno, setas indicando células endoteliais marcadas positivamente para as reações de TUNEL na interface trombo-vaso; Contra-coloração com hematoxilina, Barra= 10 μ m

5.6 Reações de Imunoistoquímica para Bax

Células endoteliais de fragmentos de pele de coelho inoculadas com veneno de *L. similis*, com característica de apoptose apresentaram marcação positiva. As reações de imunoistoquímica qualitativas foram positivas para Bax, para as células endoteliais em apoptose (FIG. 26). Houve marcação positiva para Bax também na interface trombo-vaso (FIG.26).

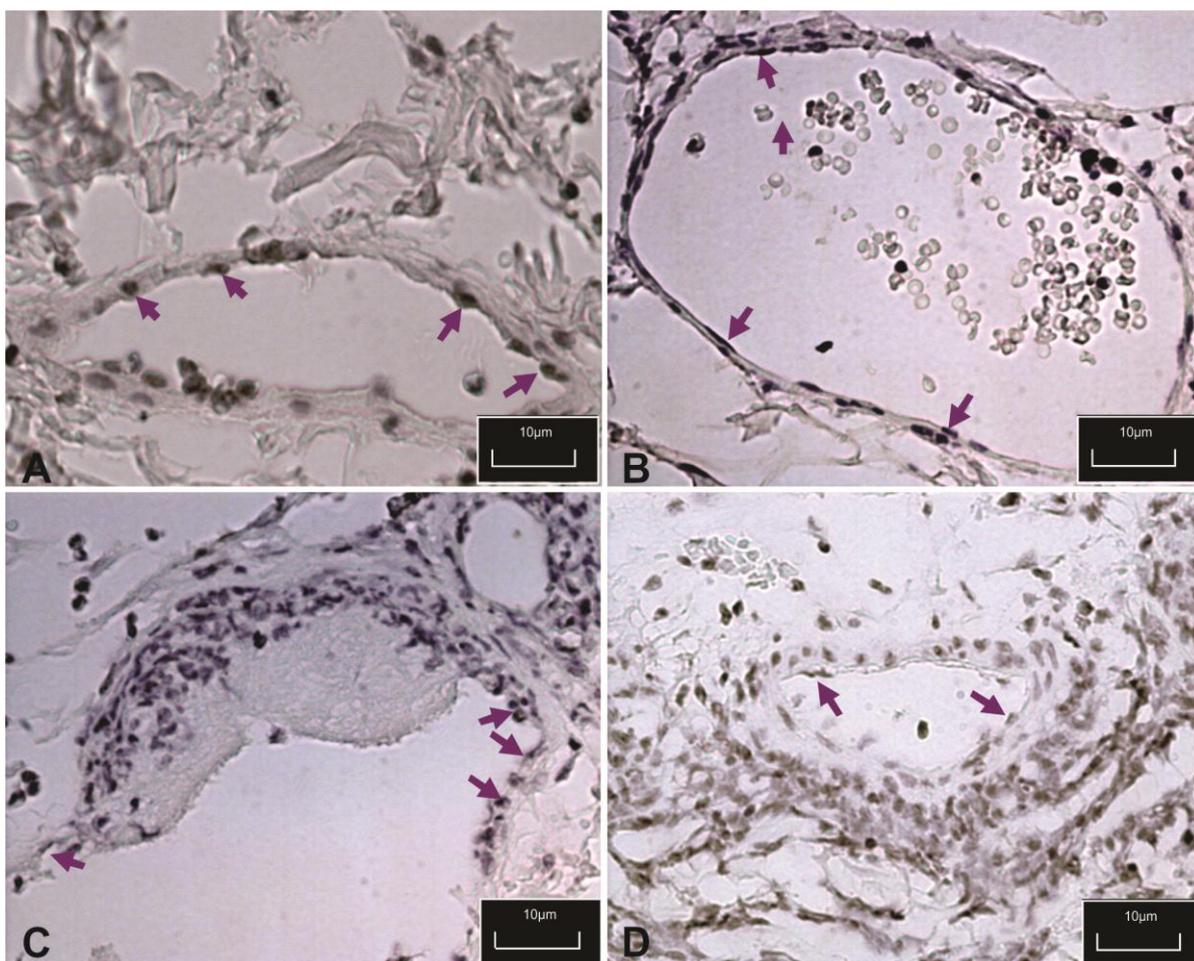


FIGURA 26 – Pele de coelho (A) 2h , (B) 4h , (C) 6 h e (D) 8 horas após injeção de veneno, setas indicando células endoteliais apresentando marcação positiva para as reações de Bax - Contra-coloração com hematoxilina. Barra= 10 µm

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a injeção intradérmica de 0,5 µg do veneno de *Loxosceles similis* em coelhos induziu uma lesão vermelho-arroxeadada, quente, edemaciada e sensível ao toque, caracterizando um processo inflamatório agudo também descrito outros autores na fase inicial do loxoscelismo (FUTRELL *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2007). A análise macroscópica da lesão 2, 4, 6 e 8 horas após a injeção experimental do veneno indicou que a área lesada aumentou diametralmente e se aprofundou com o passar do tempo, atingindo inclusive a musculatura dorsal do animal. Outros autores fazem menção ao que eles denominaram espalhamento gravitacional do veneno no loxoscelismo induzido por outras espécies de *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; Da SILVA *et al.*, 2004; SWASON & VETTER, 2006). Neste trabalho, o espalhamento do veneno pode ser inferido por meio da ampliação da lesão tanto diametralmente quanto em profundidade. De acordo com Da Silveira *et al.* (2006), a presença de hialuronidases no veneno, que degradam o ácido hialurônico e resíduos de sulfato de condroitina, pode estar relacionada à difusão radial da lesão. Tais enzimas atuariam também como um fator de disseminação sistêmica, facilitando a difusão de outras toxinas do veneno (Da SILVEIRA *et al.*, 2006).

O veneno de *L. similis* também apresenta propriedades biológicas e bioquímicas similares as dos venenos de *L. gaucho* e *L. laeta* (BÁRBARO *et al.*, 1994; BARBARO & MOTA, 1995). Adicionalmente, ele apresenta características similares ao de *L. intermedia* quanto ao perfil de bandas proteicas, diferindo apenas na intensidade de algumas bandas (SILVESTRE *et al.*, 2005). Macroscopicamente, Silvestre *et al.*, (2005) observou a habilidade da *L. similis* induzir dermonecrose em coelhos utilizando 10µg de veneno. No entanto, até o momento não relatos na literatura sobre a lesão histológica provocada pela *L. similis*.

A injeção experimental intradérmica de veneno bruto de 0,5 µg de *L. similis* em coelhos resultou uma dermatite aguda fibrino-hemorrágica grave e miosite necrosante, onde se observam: edema, vasodilatação, infiltrado inflamatório predominantemente heterofílico, trombose, exsudação de fibrina, hemorragia,

necrose fibrinóide da parede vascular, além de necrose muscular. As lesões microscópicas foram similares às aquelas observadas para as outras espécies de *Loxosceles* de importância médica (SMITH & MICKS, 1970; REES *et al.* 1981; STRAIN *et al.* 1991; OSPEDAL *et al.*, 2002). No entanto, os estudos que envolvem outras *Loxosceles* abordam a análise microscópica a partir de seis horas de injeção intradérmica do veneno loxoscélico em coelhos.

Neste estudo foram realizadas análises morfométricas para que se pudesse acompanhar a progressão da lesão histológica e avaliar a significância estatística do edema, da vasodilatação e do infiltrado inflamatório presentes na lesão, já que há poucos estudos que envolvam esses fenômenos no loxoscelismo. A análise morfométrica do diâmetro médio dos vasos sanguíneos mostrou que a diferença estatística foi significativa ($P < 0,05$) entre os animais tratados e controles em todos os intervalos de tempo. Esses dados mostram que o veneno da *L. similis* possui ação vasodilatadora, já observada no loxoscelismo induzido por outras *Loxosceles*, ação que é intermediada pela histamina (RATTMANN *et al.*, 2008; BARBARO *et al.*, 2010). Vários autores utilizam a morfometria de vasos sanguíneos como ferramenta de estudo para a vasodilatação (BECK *et al.*, 1984; TERAYAMA *et al.*, 1996; HOTTA *et al.*, 2004). Alterações no calibre vascular começam logo após uma lesão que conseqüentemente levará a uma vasodilatação. Isso leva a um aumento no fluxo sanguíneo, que também foram observados macroscopicamente nos coelhos injetados com veneno de *Loxosceles similis*. A vasodilatação é rapidamente seguida por um aumento na permeabilidade vascular, que fará com que líquidos extravasem para o tecido extravascular. Esse extravasamento acentuado de fluidos e o seu conseqüente acúmulo no tecido intersticial causam o edema. O edema foi avaliado também morfometricamente através da mensuração da espessura da pele, que foi significativamente maior a partir de 2 horas de injeção com veneno de *Loxosceles similis*. Os presentes resultados são similares aos de Rattmann *et al.*, (2008) que mostraram a ação vasodilatadora e o aumento de permeabilidade induzidos pelo veneno de *L. intermedia* em modelo de ratos.

Adicionalmente, por meio da mensuração do infiltrado inflamatório mostra-se que ele aumenta progressivamente neste estudo a partir do intervalo de 2 horas se tornando muito intenso no intervalo de 8 horas. Outros autores também observaram infiltrado inflamatório intenso que aumentou com o passar do tempo

pela exposição ao veneno da *L. laeta* e *L. intermedia* (PATEL *et al.*, 1994; OSPEDAL *et al.*, 2002; ZANETTI *et al.*, 2002). Os dados morfométricos aqui apresentados permitiram o acompanhamento da dinâmica do processo inflamatório que ocorre neste estudo desde 2 horas até 8 horas após a injeção de 0,5µg da do veneno bruto de *L. similis*. Com o decorrer do processo, a dermatite aguda fibrino-hemorrágica ora observada progride para uma dermatite necro-ulcerativa de difícil cicatrização (FUTRELL, 1992). Os parâmetros morfométricos permitem tanto o acompanhamento da dinâmica do processo, como também auxiliam nos estudos relacionados ao tratamento ou à eficácia de soros. Ferramentas morfométricas já têm sido utilizadas nos estudos relacionados ao tratamento com soros anti-loxoscélicos, como por exemplo, para avaliar se a soroterapia diminui o edema e o infiltrado inflamatório (BARBARO *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2011; TAMBOURGI *et al.*, 2005).

Através do cultivo de células do cordão umbilical Tambourgi *et al.*, (2005) mostraram que o veneno de *L. reclusa* ativa a célula endotelial que por sua vez induz ativação de neutrófilos os quais liberam enzimas. No presente estudo, apesar da análise do infiltrado inflamatório não ter sido diferencial, foi possível observar o predomínio de heterófilos, através de cortes semi-finos corados com azul de toluidina ou hematoxilina/eosina. O termo heterófilo ao invés de neutrófilo foi utilizado nos resultados deste estudo, pois no coelho e em outras espécies como cobaia, galinhas, répteis e aves, o heterófilo é funcionalmente análogo aos neutrófilos (TRINDADE, 1954, KOZMA *et al.*, 1974, SONG *et al.*, 1994).

No presente trabalho, foi possível observar também através de cortes semi-finos a presença de células endoteliais com núcleo retraído, contendo carioteca com convoluções e cromatina condensada, compactada na carioteca (crescentes), caracterizando apoptose já no intervalo de 2 horas após a injeção intradérmica de 0,5 µg veneno bruto de *L. similis*. Esses dados foram corroborados por meio da marcação positiva de células endoteliais na derme de animais do grupo tratado pela reação de TUNEL e das reações de imunistoquímicas para Bax. Além disso, as células endoteliais em apoptose estavam presentes na interface trombo-vaso. A apoptose é um tipo de morte celular programada, ativa e altamente regulada por diversos genes dentre eles c-myc, bcl-2, p53 e ras (WYLLIE, 1992). Esse tipo de morte celular é caracterizado morfologicamente por uma retração celular,

condensação de cromatina e fragmentação de DNA promovida por endonucleases. A fragmentação *in situ* do DNA pode ser detectada através da técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick end labeling).

Estudos *in vitro* com cultivo de células endoteliais da aorta de coelhos, tratadas com veneno de *L. intermedia*, evidenciaram a perda de adesão entre as células e dessas com o substrato. Análises histológicas de secções da pele de coelho tratadas com veneno de *L. intermédia*, processadas para microscopia eletrônica de transmissão e avaliados 4 horas após a injeção do veneno mostraram que o veneno provoca degeneração da parede dos vasos e vacúolos no endotélio. O veneno tem efeito deletério tanto *in vivo* quanto *in vitro* removendo importantes constituintes relacionados com a adesão de células endoteliais (VEIGA *et al.*, 2001). Apesar das evidências morfológicas serem fortemente sugestivas de apoptose nos estudos de Veiga *et al.*, (2001), as alterações sofridas pelas células endoteliais sob ação de venenos loxoscélicos nesse artigo não foram relacionadas com apoptose. Segundo Bombeie *et al.* (1997) as células endoteliais apoptóticas se tornam pró-coagulantes pelo aumento da expressão de fosfatidilserina e pela perda de componentes anticoagulantes da membrana. Dessa forma, as células endoteliais apoptóticas contribuem para o desenvolvimento de um estado pró-trombogênico (BOMBELI *et al.*, 1997). Esse é um dos possíveis fatores que contribuem para a formação do trombo no loxoscelismo cutâneo.

A formação de trombos é resultado da ativação patológica do processo de coagulação sanguínea, que ocorre quando existe alteração no fluxo, na hipercoagulabilidade do sangue ou quando existe lesão endotelial. No caso do loxoscelismo cutâneo, a formação do trombo está relacionada com a lesão no endotélio. As alterações endoteliais observadas no loxoscelismo se devem ao fato do veneno apresentar efeito direto sobre o endotélio, agindo tanto nas células endoteliais quanto na membrana basal subendotelial, estrutura de extrema importância para a integridade dos vasos (VEIGA *et al.*, 2001a). Outro fator que poderia favorecer a trombose no loxoscelismo seria o desnudamento da superfície vascular em decorrência do processo de apoptose endotelial. Sabe-se que o desnudamento do endotélio pode ser causado por fluxo turbulento, espasmo vascular, vasoespasmo ou pelo aumento do apoptose das células endoteliais (XU *et al.*, 2009). Xu *et al.*, (2009) provaram que há uma forte relação entre apoptose

endotelial, desnudamento do endotélio e trombose. Os mesmos autores mostraram que a descamação da placa ateromatosa via apoptose predispõe à trombose, consequência comum da aterosclerose. Assim, a ação direta do veneno de *L. similis*, ao conduzir à perda do revestimento vascular, permite o contato direto do sangue com o colágeno subendotelial com consequente adesão, agregação plaquetária e ativação da cascata de coagulação via intrínseca (MACKMAN *et al.*, 2007).

Uma vez formados os trombos, segue-se o processo de necrose e ulceração, cuja extensão é variável, porém capaz causar as alterações características observadas no loxoscelismo cutâneo.

Alguns estudos bioquímicos têm sido conduzidos e demonstram que a família de proteínas *Loxtox* causam grande parte das alterações dermonecroticas, hemólise, agregação plaquetária, aumento da permeabilidade e resposta inflamatórias (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

Com o presente estudo podemos concluir que os intervalos de tempo e a concentração do veneno (0,5 µg) ora utilizados, estão sendo relatados pela primeira vez através deste estudo. O presente trabalho caracteriza a potente ação do veneno de *L. similis*, mesmo com uma dosagem e tempo bem inferiores aos já descritos para outras espécies de *Loxosceles* (VEIGA *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2005; PALUDO *et al.*, 2006; MCGLASSON *et al.*, 2007; RIBEIRO, 2007) já é capaz de causar lesão. Além disso, os tempos de injeção de veneno utilizados por diversos autores sempre foram superiores a 2 horas, já que os trabalhos não tinham como foco o estudo da apoptose das células endoteliais, nem a sua relação com a formação de trombos.

Com base nos presentes dados pode-se concluir que a apoptose de células endoteliais, está envolvida com a formação dos trombos e consequente necrose e ulceração observados no loxoscelismo. Ao que tudo indica, a intensa inflamação que se segue é um fator que agrava a lesão podendo contribuir para o desenvolvimento da resultante úlcera de difícil cicatrização.

7 CONCLUSÕES

- O veneno de *L. similis* induz apoptose de células endoteliais dos plexos dérmicos em coelhos.
 - A apoptose de células endoteliais contribui para a patogenia da trombose que se desenvolve no loxoscelismo experimental em coelhos induzido pelo veneno bruto de *L. similis*.
 - A proteína Bax participa da via apoptótica induzida pelo veneno bruto de *L. similis* em células endoteliais dos plexos dérmicos em coelhos.
-

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AFFARA, M.; DUNMORE, B. *et al.* Understanding endothelial cell apoptosis: what can the transcriptome, glycome and proteome reveal? *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 362, 1469–1487, 2007.

ÁLVARES, E. S. S.; RODRIGUES, T.; DE MARIA, M. On *Loxosceles anomala* (Mello Leitão) (Araneae: Sicariidae). *Revista Ibérica de Aracnología*, v. 10, p. 293-295, 2004.

AMEISEN, J.C.; CAPRON, A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunology Today.*, v.12, p.102-105, 1991.

ANGELIS, E.; MOSS, H. S.; POUTON, C. W. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 18 193-218, 1996.

APPEL, M. H.; Da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; Da SILVA, P.H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider *Loxosceles intermedia* venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, v.1780, p.167- 178, 2008.

ARENDS, M. J., WYLLIE, H. A. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, v.32, p. 223-254, 1991.

AUSTIN, S. K. Haemostasis. *Science basic*, 2008.

BACHETTI, T.; MORBIDELLI, L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacological Research, England*, v.42, p.9 -19, 2000.

BARBARO, K. C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon*, England, v. 45, p. 489-499, 2005.

BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; ARAÚJO, C. A; PAREJA-SANTOS, A.;TÁVORA B. C; PREZOTTO-NETO, J. P.; KIMURA, L. F.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA; M.; SANTORO, M. L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon*, 56, 972-9, 2010.

BARBARO, K. C.; SOUSA, M. V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *Journal of protein chemistry*, United States, v.15, p.337- 343, 1996.

- BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon.*, 30, 331- 338, 1992.
- BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I.; Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American Brown spider) venom. *Toxicon.*, V. 32, p. 687-693, 1994.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.*, 8, 328- 38, 2001.
- BECK, D.W.; HART, M. N; HANSEN, K. E. Effect of Intracarotid Hyperosmolar Mannitol on Cerebral Cortical Arterioles a morphometric Study. *Stroke.*, 15, 134-136, 1984.
- BERGMEIER, W. *et al.* The role of platelet adhesion receptor GPIb alfa far exceeds that of its main ligand, Von willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc. Natl Acad Sci, USA*, 103, 16900-5, 2006.
- BOMBELI, T. *et al.* Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood.*, 89, 2429-2442, 1997.
- BOMBELI, T. *et al.* Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood.*, 93, 3831-3838, 1999.
- BRAVO, M. L.; PURATIC, O. S.; BEHN, C. T.; FARDELLA, C. B.; CONTRERAS, A. F. Hemolysis induced by *Loxosceles laeta* venom. *In vitro* experience. *Rev. Med. Chil.*, v. 121, p. 16–20, 1993.
- BUGTUBEORG, W. P. I. Brown Recluse Spider 2009. Disponível em <<http://www.youtube.com/watch?v=pP0e9K9-H9A>> Acesso em Fevereiro de 2010.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249–257, 2000.
- CARVALHO, M. H. C; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R. C. A; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens.*, 8, 76-88, 2001
- CHAIM, O. M. Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*) com ênfase no efeito nefrotóxico. 2005. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Paraná, 2005.
- CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, United States, v.221, p. 64-77, 2006.
-

CHIPUK, J.; FISHER, J.; DILLON, C.; KUWANA, T.; KRIWACKI, R.; GREEN, D. Mechanism of apoptosis induction by the inhibition of BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci.*, 105 (51), 20327-20332, 2008.

CHIPUK, J.; GREEN, D.; How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, 18(4), 157-164, 2008.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326 (1), 1–16, 1997.

COHEN, J. J.; DUKE, R.C. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Vet. Immunol.*, v.10, p.267-293, 1992.

COHEN, J. J.; FADOK, V.A.; SELLINS, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann. Rev. Immunol.*, v.10, n.1, p.267-293, 1992.

CUNHA, R. B.; BARBARO, K. C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F. C. V.; FONTES, W.; SOUSA, M. V. Purification and characterization of Loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. *Journal of protein chemistry*, United States, v.22, p.135–146, 2003.

Da SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, v. 44, p. 693-709, 2004.

Da SILVEIRA, R. B.; FILHO, J. F. S.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon*.40, 815-822, 2002.

Da SILVEIRA, R. B.; ROMINE, B. P. CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; DREYFUSS, J. L. TORNA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie*, France, v.59, p. 289-300, 2007a.

Da SILVEIRA, R. B.; ROMINE, B. P.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. C.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of demonecrotix toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie*, France, v.88, p.1241-1253, 2006.

Da SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C. M.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R. C.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. *Biochemical Journal*, England, v.406, p.355-363, 2007b.

- Da SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, England, v.49, p.758-768, 2007c.
- DEBNATH, A.; CHATTERJEE, U. D. A. S, M.; VEDASIROMONI, J. R., GOMES, A. Venom of Indian monocellate cobra and Russell's viper show anticancer activity in experimental models. *J Ethnopharmacol.* p. 681-684, 2007.
- DUBOIS, C.; BROEKMAN, M. J. et al. Glycoprotein VI dependent and independent pathways of thrombus formation *in vivo*. *Blood.*, 107, 3902-3906, 2006.
- DURAND, E. *et al.* *In vivo* induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation: a clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion. *Circulation*, 109, 2503–2506, 2004.
- ELLIS, H. M; HORVITZ, H. R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, v. 44, p. 817, 1991.
- ELSTON, M. D.; EGGERS J. S.; SCHDMIT, W. E *et al.* Histological findings after brown recluse spider envenomation. *A. J. Dermatopath.*, 22, 242-246, 2000.
- FADOK, V. A.; HENSON, P.M. Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr. Biol.*, v.8, p.R693-R6951, 1998.
- FADOK, V. A; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology*, Vol 148, Issue 7, 2207-2216, 1992.
- FALEIROS, R. R.; NUOVO, G. J.; BELKNAP, J. K. Calprotectin in Myeloid and Epithelial Cells of Laminae from Horses with Black Walnut Extract-Induced Laminitis. *J Vet Intern Med*, 23,174–181, 2009.
- FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C. Q. B.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*, England, v. 36, p. 1039-1051, 1998.
- FERRER, VALÉRIA PEREIRA. Clonagem e Expressão Heteróloga de Hialuronidase e Alérgeno presentes no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*). 2010. 102p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2010.
- FESUS, L., THOMAZY, V., FALUS, A. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBES Lett.*, v. 224, n. 15, p. 104-108, 1987.
-

- FISHER, S. A.; LANGILLE, B. L.; SRIVASTAVA, D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ. Res.* 87, 856–864, 2000.
- FOIL, L. D; NORMENT, B. R. Envenenation by *Loxosceles reclusa*. *J. Med Entomol.*, 16, 18-25, 1979.
- FUGIER-VIVIER, I., SERVET-DELPRAT, C., RIVAILLER, P., RISSOAN, M.C.; LIU, Y.J.; RABOURDIN-COMBE, C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.*, v. 186, p. 813-823, 1997.
- FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanism of thrombus formation. *The new England journal of medicine.*, 359 (9), 938-949, 2008.
- FUTRELL, JM. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.*, v. 304, p. 261-267, 1992.
- GAJARDO-TOBAR, R. R. Minha experiência sobre loxoscelismo. *Mem. Inst. Butantan.*, v. 33, p. 689-698, 1966.
- GAO, L.; SHAN, B. E.; CHEN, J.; LIU, J. H.; SONG, D. X.; ZHU, B. C. Effects of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Acta Pharmacol Sin.*, v. 26, p. 369-76, 2005.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, v. 119, n. 3, p.493-501, 1992.
- GERTSCH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). *Bulletin of American Museum of Natural History.*, v. 136, p. 117-174, 1967.
- GREEN, D. R.; KROEMER, G. The central executioners of a apoptosis: Caspases or mitochondria? *Trends in Cell Biology*, 8, 267-71, 1998.
- GROSS, A.; JOCKEL, J.; WEI, M. C.; KORSMEYER, S. J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.*, 17, 3878-3885, 1998.
- GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 family members and the mitochondrial in apoptosis. *Genes Dev.*, v.13, p.1899-1911, 1999.
- HALL, A. V.; JEVNIKAR, A. M. Significance of endothelial cell survival programs for renal transplantation. *Am. J. Kidney Dis.*, 41, 1140–1154, 2003.
- HOTTA, H.; KANAI, C.; UCHIDA, S.; KANDA, K. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases diameter of the parenchymal blood vessels in the rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters*, 358, 103–106, 2004.
-

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S. Endothelium-dependent modulation of cyclic GMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ. Res.*, 60, 82-92, 1987.

ITO, M.; WATANABE, M.; IHARA, T.; KAMIYA, H.; SAKURAI, M. Measles virus induces apoptotic cell death in lymphocytes activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus calcium ionophore. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 108, p. 266-271, 1997.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONÇALVES-DORNELAS, H.; De CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F. G.; LABORNE, F. V.; De MOURA, J. F.; VEIGA, S. S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K. C. The *Loxtox* protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon.*, 50, 938-46, 2007.

KERR, J. F. R. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: LAVIN, M., WATERS, D. Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis. *Chur: Harwood*, p. 1-18, 1993.

KERR, J. F. R. Personal account of events leading to the definition of the apoptosis concept. *Res. Problems Cell Differ.*, v. 23, p. 1-10, 1999.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J. Pathol.*, v.107, p.41-44, 1972.

KORSMEYER, S. J. BCL-2 gene family and regulation of programmed cell death. *Cancer Res.*, v.59, p.1693-1700, 1999.

KOZMA, M.; CONNER, M. Anatomy, Physiology, and Biochemistry of the Rabbit in the Biology of the Laboratory Rabbit, *Academic Press.*, 50-72, 1974.

KRUPNICK, A. S. *et al.* Mechanism of T cell-mediated endothelial apoptosis. *Transplantation*, 74, 871–876, 2002.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie*, v. 90, p. 1722-1736, 2008.

LIP, G. Y. H.; GIBBS, C. R. Does heart failure confer a hypercoagulable state? Virchow's Triad. *Journal of the American College of Cardiology.*, 33, 5, 1999.

LUCIANO, M. N.; SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom on renal tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 52, 455-467, 2004

- MACHADO, E. O.; ÁLVARES E. S. S.; MARIA, M. De; KALAPOTHAKIS, E.. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* v. 6, p. 113-115, 2005.
- MACKMAN, N.; TILLEY, R. E.; KEY, N. S. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 27, 1687-1693, 2007.
- MALLAT, Z.; TEDGUI, A. Apoptosis in vasculature: mechanism and functional importance. *British Journal of pharmacology.*, 130, 947-962, 2000.
- MANGIN, P.; YAP, C. L.; NONNE, C. et al. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with plaque GPVI/FcR gamma deficiency. *Blood.*, 107, 4346 – 4353, 2006.
- MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, un problema de salud en el Perú. *Bol. San. Panam.*, Washington, 103 (4), p.378-386, 1987.
- MASBERG, S. et al. A crucial role of glycoprotein VI for plaquet recruitment to the injured arterial wall *in vivo*. *J. Exp Med.*, 197, 41-9, 2003.
- MCGLASSON, D.L.; HARROFF, H. H.; SUTTON, J.; DICK, E.; ELSTON, D. M. Cutaneous and systemic effects of varying doses of brown recluse spider venom in a rabbit model. *Clin. Lab Sci. Spring*, 20(2), 99-105, 2007b.
- MEHTA, U.; KANG, B. P.; BANSAL, G.; BANSAL, M. P. Studies of apoptosis and bcl-2 in experimental atherosclerosis in rabbit and influence of selenium supplementation. *Gen. Physiol. Biophys.*, 21, 15–29, 2002.
- MICHELS, C. Endothelial cell function. *Journal of cellular physiology.*, 196, 430-443, 2003.
- MINEO, C.; DEGUCHI, H.; GRIFFIN, J. H.; SHAUL, P. W. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ. Res.*, 98, 1352–1364, 2006.
- MORO L., MARTINS, A.S., ALVES, C.M., SANTOS, F. G. A., CARNEIRO, R. A., CARVALHO, R., VASCONCELOS, A. C. Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol.*, v.148, p.153-164, 2003a.
- MORO L., VASCONCELOS, A. C., MARTINS, A.S. Etoposide-induced apoptosis in murine neuroblastoma (N2A) cells infected with Paramyxoviruses. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 1. p. 44-55, 2003b.
- MOURA, J.; FELICORI, L.; MOREAUC, V.; GUIMARÃES, G.; DIAS –LOPES C. et al., Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine.*, 29, 7992-8001, 2011.
-

NORATA, G. D.; TONTI, L.; ROMA, P.; CATAPANO, A. L. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 12, 297–305, 2002.

NOWATZKI, J. Células endoteliais expostas ao veneno de *L. intermedia* são induzidas à apoptose pelo desalojamento celular (*anoikis*) sendo que a ação direta das toxinas é inibida pelo proteoglicano de heparam sulfato. 2009. Dissertação de mestrado em Biologia celular e molecular. Universidade Federal do Paraná, 2009.

OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M. H.; NETO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. *Int. J. Exp. Pathol.* v. 83, p. 287-294, 2002.

PALMER, R.M.J; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Release of nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327,524-526, 1987.

PALUDO, K.S.; GREMSKI, L. H.; VEIGA, S. S, CHAIM, O. M.; GREMSKI, W.; DE FREITAS BUCHI, D.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; FRANCO, C. R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon*, 47, 844-53, 2006.

PATEL, K. D.; MODUR, V.; ZIMMERMANN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTRY, T.M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8 and E selectin expression. *Journal of Clinical Investigation*, United States, v.94, p.631- 642, 1994.

PEARSON, J. D. Endothelial cell biology. *Radiology*.179, 9-14,1991.

PEITSH, M. C.; POLZAR, B.; STEPHAN, H.; COMPTON, T.; MacDONALD, H. R.; MANNHERZ, H. G.; TSCHOOP, J. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.*, v. 12, p. 371-377, 1993.

PEREIRA, N. B.; CAMPOS, L. P.; VIEIRA, F. O; VERÇOSA, B. L. A.; Vasconcelos, A. C.; Moro, L. Abordagem Histopatológica e morfométrica no Loxoscelismo Cutâneo visceral. In: ENAPAVE- Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 2009, Águas de Lindóia - SP. ENAPAVE 2009.

PEREIRA, N.B; BRAGA, L. KALAPOTHAKIS, E. VASCONCELOS, A. C. ; MORO, L. Epidemiologia do Loxoscelismo em Minas Gerais, 2010. I Jornada acadêmica de toxicologia clínica, Belo horizonte. Universidade Federal de Minas de Gerais, 2010.

PIZZI, T.P.; ZACARÍAS, J.S.; SCHENONE, H. F. Estudio histopatológico experimental en el envenenamiento por *Loxosceles laeta*. *Biologica.*, 23, 33–51, 1957.

RATTMANN, Y. D.; PEREIRA, C. R.; CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M. C. A.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon*, 51, 363-72, 2008.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. v.17, p.3225-3236, 1998.

REES, R. S.; NANNEY, L. B.; YATES, R. A.; KING, L. E. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: the inciting mechanism? *J. Invest. Derm.*, 83, 270-275, 1984.

REES, R.; SHACK, R. B.; WITHERS, E.; MADDEN, J.; FRANKLIN, J.; LYNCH, J. B. Management of the brown recluse spider bite. *Plast Reconstr Surg.*, 68(5), 768-73, 1981.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; SILVEIRA, B. S.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. P.; SENFF- RIBEIRO, A.; MOURA, J.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. *Toxin*, England, v.50, p.1162-1174, 2007.

ROBBINS, S. L; COTRAN, R. S. Bases patológicas das doenças. KUMAR, V. *et al.*, [tradução de Patrícia Dias Fernandes... et al.]. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

RODRIGUES, C. J. H.; PARAS, Z. M. S.; NOBREGA, M. M.; TORRES, J. B. Acidentes com aracnídeos. *Revista HCPA*. v. 6, p. 91-96, 1986.

RUGGERI, Z. M. Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation. *J Clin Invest.*, 105 (6), 699–701, 2000.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada a experimentação animal. 3ed. Belo Horizonte: Fundação de estudo e pesquisa em medicina veterinária, 2007.

SAVILL, J.; FADOK, V.; HENDSON, P.; HASLETT, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, v. 14, p. 131-136, 1993.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS A.; VILARROEL, F. Loxoscelismo en Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v.31, p. 403-415, 1989.

SCHUTZE, M.; MAGALHÃES, S. Imagem da Semana - Faculdade de Medicina da UFMG. Faculdade de Medicina da UFMG. 2010.

SCHWARTZ, M. A. Integrin signaling revisited. *Trends in cell biology*, England, v.11, p.466-470, 2001.

- SEGURA, I. *et al.* Inhibition of programmed cell death impairs *in vitro* vascular-like structure formation and reduces *in vivo* angiogenesis. *FASEB J.*, 16, 833–841, 2002.
- SHEPPARD, H. W., ASCHER, M. S. AIDS and programmed cell death. *Immun. Today*, v. 12, p. 423, 1991.
- SILVEIRA, A. L. Primeiro registro sinantrópico de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) no Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 42(6), 723-726, 2009.
- SILVESTRE, F. G.; CASTRO, C. S.; DE MOURA, J.F.; GIUSTA, M.S.; DE MARIA M, ÁLVARES, É. S. S.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; GONÇALVES, L. A.; GUBERT, I. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS E. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon.*, 46, 927-936, 2005.
- SINAN - Sistema de Informação de Agravos Notificáveis. Disponível em <www.saude.gov.br/sinanweb> acessado em Fevereiro de 2009.
- SMITH, W. C.; MICKS, W. D. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider (*Loxosceles reclusa*). *Lab. Invest.* v. 22, p. 90-93, 1970.
- SONG, B. Z.; DONOFF, R. B.; TSUJI, T.; TODD, R. *et al.*, Identification in cutaneous of rabbit eosinophils healing wounds and heterophils. *Histochemical Journal*, 25,762-771, 1993.
- STRAIN, G. M. SINDER, T.G.; TEODORO, B.L.; COHN, G.H. Hyperbaric oxygen effects on brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in rabbits. *Toxicon*, 29, 989-996, 1991.
- SUNDERKÖTTER, C.; SEELIGER, S.; SCHÖNLAU, F.; ROTH, J.; HALLMANN R; LUGER, T. A.; SORG, C.; KOLDE, G. Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. *Exp Dermatol.*, 10(6), 391-404, 2001.
- SWASON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. *Clinics in Dermatology.*, 24, 213–221, 2006.
- TAMBORGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; EICKSTEDT, V. R. D.; BENEDETTI, Z. C.; PETRICERVICH, V. L.; SILVA, W. D. Incorporation of a 35 kDa purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms humans erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *J. Immunolol*, 155, 4459-4466, 1995.
- TAMBOURGI, D.V.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; ANDRADE, R. M. G. *Loxosceles* Sphingomyelinase Induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil
-

infiltration, and endogenous gelatinase expression. *J Invest Dermatol.*, 124, 725 – 731, 2005.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Apoptosis, a major determinant of atherothrombosis. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.*, 96, 671–675, 2003.

TENNISWOOD, M.; TAILLEFER, D.; LAKINS, J. Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues. In: TOMEI, L. D., COPE, F. O., (eds.). *Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease*. New York: Springer, p. 283-311, 1994.

TERAYAMA, N.; TERADA, T.; NAKANUMA, Y. A. Morphometric and Immunohistochemical Study on Angiogenesis of Human Metastatic Carcinomas of the Liver. *Hepatology*, 24, 816-9, 1996.

THORNBERRY, N. A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspases family and granzyme B: Function relationships for key mediator of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.17907-17911, 1997.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 281, 1312-1316, 1998.

TRENTINI, R. P. Fatores antrópico-ambientais determinantes para o aumento de acidentes loxoscélicos no município de Curitiba – paraná. Dissertação apresentada ao programa Análise e Gestão Ambiental no Setor de Ciências da Terra, Departamento de Geografia da Universidade Federal do Paraná, 2005.

TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.*, 7(12), 1174-81, 2000.

VAN DER BERG, C. W.; GONÇALVES-de-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; TAMBOURGI, D. V. *Loxosceles* spider venom induces the release of thrombomodulin and endothelial protein C receptor: implications for the pathogenesis of intravascular coagulation as observed in loxoscelism. *Journal of thrombosis and haemostasis*, England, v.5, p.989-995, 2007.

VASCONCELOS, A. C. Virus-induced apoptosis in avian lymphoid tissues. Tese de Doutorado. Davis: University of California. 134 p,1994.

VASCONCELOS, A. C.; LAM, K. M. Apoptosis in chicken embryos induced by the infectious bursal disease virus. *J. Comp. Path.*, v. 112, p. 327-338, 1995.

VASCONCELOS, A. C.; LAM, K. M. Apoptosis induced by the infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.*, v. 75, 1994.

VEIGA, S. S.; da SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine

proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, v. 38, p. 825-839, 2000a.

VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; dos SANTOS, V. L. P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon*, England, v.37, p. 587-607, 1999.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; BRAZ, A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Brasilian Journal of medical and biological research*, v. 34, p.843-850, 2001a.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; PORCIONATTO, M. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thrombosis Research*, v. 102, p. 229-237, 2001b.

VEIGA, S. S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V. L. P.; SOUZA, G. A.; RIBEIRO, A. S.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *The histochemical journal*, v. 32, p. 397-408, 2000b.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. *International journal of dermatology*, United States, v.37, p.481-496, 1998.

WOYWODT, A.; STREIBER, F.; DE GROOT, K.; REGELSBERGER, H.; HALLER, H.; HAUBITZ, M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet* 361, 206–210, 2003

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, v. 284, n. 5756, p. 555-556, 1980.

WYLLIE, A.H.; ARENDS, M.J.; MORRIS, R. G.; WALKER, S. W.; EVAN, G. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol.*, 4(6), 389-97, 1992.

XU, F.; SUN, Y.; CHEN, Y. et al. Endothelial cell apoptosis is responsible for the formation of coronary thrombotic atherosclerotic plaques. *Tohoku, J. Exp. Med.* 218, 25-33, 2009.

YIANNIAS, J.A.; WINKELMANN, R. K. *Persistent painful plaque due to a brown recluse spider bite.* *Cutis.*,50 (4), 273-5, 1992.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*, England, v. 39, p. 391–400, 2001.

ZANETTI, V. C.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, England, v. 13, p.135-148, 2002.

ZHANG, J. Y; CAO, Y. X.; XU, C. B. ; EDVINSSON, L. Lipid-soluble smoke particles damage endothelial cells and reduce endothelium-dependent dilatation in rat and man. *BMC Cardiovascular Disorders*, 6, 3, 2006.

ZHANG, W., LI, D. ; MEHTA, J. L. Role of AIF in human coronary artery endothelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 286, p.354-358, 2004.
