

Flávio Luiz Tavares

Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente pelo veneno loxoscélico em coelhos

SÃO PAULO
2007

Flávio Luiz Tavares

Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente pelo veneno loxoscélico em coelhos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção de Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Dra. Ida Sigueko Sano-Martins

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1870
FMVZ

Tavares, Flávio Luiz

Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente pelo veneno loxoscélico em coelhos. / Flávio Luiz Tavares. – São Paulo : Flávio Luiz Tavares, 2007.
105 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Dra. Ida Sigueko Sano-Martins

. 1. *Loxosceles*. 2. Plaquetas. 3. Agregação. 4. Adesão. 5. Dermonecrose.
I. Título.

ERRATA

TAVARES, F. L. **Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente em coelhos pelo veneno loxoscélico.** [Contribution to the study of the *in vitro* action induced by the venom of the brown spider, *Loxosceles gaucho*, on human and rabbit platelets. Platelet participation in the dermonecrotic lesion experimentally induced in rabbits by the loxoscelic venom]. 2007. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê		Leia-se	
Resumo	1	3	dermonecrose experimentalmente pelo veneno loxoscélico.	induzida em coelhos	dermonecrose experimentalmente loxoscélico em coelhos.	induzida pelo veneno loxoscélico em coelhos.
Abstract	1	6	experimentalmente coelhos pelo loxoscélico.	em veneno	experimentalmente veneno loxoscélico coelhos.	pelo em



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)

Av. Dr. Vital Brazil, 1500 CEP 05503-900 Tel. 011-37267222 r.2239 Fax 011-37261505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 129/2003, referente ao projeto “Estudo do processo inflamatório e da lesão dermonecrotica induzidos em coelhos pelo veneno de *Loxosceles gaucho*: participação e importância das plaquetas”, de responsabilidade da Dra. Ida Sigueko Sano-Martins está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

São Paulo, 04 de agosto de 2003.



Wilson Fernandes

Folha de Avaliação

Nome: Tavares, Flávio Luiz

Título: Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente em coelhos pelo veneno loxoscélico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção de Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Assinatura: _____

Instituto: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Assinatura: _____

Instituto: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Assinatura: _____

Instituto: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Assinatura: _____

Instituto: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Assinatura: _____

Instituto: _____

Julgamento: _____

Às insondáveis forças que movem o
universo, que conspiram para que
estejamos aqui

Agradecimentos

Aos meus pais, meus avós e à minha mais do que especial família, por tudo.

À Ida, pelo coração enorme e pela capacidade de compreender as pessoas, a ciência, o mundo. A você a minha admiração e o meu carinho.

Ao Marcelo, pela co-orientação de todos esses anos, mas sobretudo pela amizade e pelo carinho de todos os momentos. Pelo dom da serenidade nos momentos críticos. Eu e todo o laboratório te agradecemos.

À Cris, pela presença e pelo carinho de todas as horas, nos momentos alegres ou tristes. Precisaria de outra vida somente para te agradecer. Mais uma vez faltam as palavras certas, mas sobra espaço espaço pra você aqui do lado esquerdo do peito.

Carol, valeu pela força toda com as fotos. Que demais que você veio pro lab. Bibs, ainda bem que você tá por aqui, não sou mais o único insuportável.

Àqueles que viabilizam nosso trabalho no laboratório e que tornam a Fisiopatologia um ambiente de trabalho ímpar. Neusa T. Picon, Iracema S. Luiz, Neuceli J. Oliveira, Ângela M. Ferreira, Terezinha de Almeida, D. Alice, Silvana P. Oliveira (*in memoriam*), Juscelino T. Lopes e Nicolau de Braga. A vocês minha terna gratidão.

A todos os pesquisadores da Fisio: só tenho a agradecer pela oportunidade de ter convivido esse tempo todo com vocês. Muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos do peito que estarão mais um tempo na Fisiopatologia, e também àqueles que por aqui passaram e que já batem asas pela vida: a minha gratidão e meu carinho por absolutamente TODOS os momentos, saibam que os terei sempre comigo.

Aos amigos de hoje e sempre da veterinária e ao Departamento de Patologia da FMVZ-USP

À Sílvia, por ter sempre um sorriso e a sua disponibilidade para nos oferecer.

Ao McTub Menossi, pela força e pelas sugestões com as imagens.

À Magna, pela paciência (e que paciência) e alto astral na preparação dos cortes. histológicosprestatividade e alegria com que me auxiliou na histologia.

Ao Alex, pela assessoria bem humorada com as fotografias.

Ao Jorge, pelo auxílio, sempre que precisei, com as análises no citômetro de fluxo.

À Eli, por me mostrar que a distância pode ser um mero detalhe diante do imenso amor que nos une.

Este trabalho foi desenvolvido no
laboratório de Fisiopatologia com o
apoio financeiro da Fapesp

RESUMO

.....
TAVARES, F. L. **Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente em coelhos pelo veneno loxoscélico.** [Contribution to the study of the *in vitro* action induced by the venom of the brown spider, *Loxosceles gaucho*, on human and rabbit platelets. Platelet participation in the dermonecrotic lesion experimentally induced in rabbits by the loxoscelic venom]. 2007. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Os venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* possuem uma ampla gama de atividades em diferentes células, tecidos e sistemas, e é notória a sua capacidade de causar a formação da lesão dermonecrótica. Em um trabalho prévio, relatamos uma intensa trombocitopenia induzida pelo veneno loxoscélico em coelhos. Objetivou-se no presente estudo avaliar primeiramente a interação *in vitro* entre as plaquetas, humanas e de coelhos, com o veneno de *Loxosceles gaucho* e seu principal componente, a fração esfingomielinásica. Posteriormente, investigou-se o papel da plaqueta no desenvolvimento da lesão dermonecrótica através de um modelo de trombocitopenia em coelhos. Nos estudos *in vitro*, os resultados de agregação em plasma rico em plaquetas evidenciou que tanto o veneno total quanto a fração esfingomielinásica induziram um aumento desta resposta nas plaquetas das duas espécies, que foi mais intensa nas plaquetas humanas. Uma vez que em plaquetas lavadas a agregação não foi constatada, confirmou-se a necessidade de componente(s) plasmático(s) para a indução desta resposta. Ainda, os dados de LDH indicaram que o veneno total, nas concentrações aqui utilizadas, não foi capaz de causar à lise plaquetária. Com relação à ativação, o veneno total, foi capaz de aumentar a expressão da LIBS1 nas plaquetas de ambas as espécies e de P-selectina na plaqueta de coelho. Sob as nossas condições experimentais, a fração não promoveu o aumento dos marcadores de ativação. Finalizando os estudos *in vitro*, o veneno total e a fração provocaram um aumento da adesão nas plaquetas das duas espécies, sendo que a resposta à fração esfingomielinásica mostrou-se dose-dependente. O estudo experimental, por vez, necessitou de uma etapa preliminar para a obtenção de um anticorpo anti-plaqueta, produzido em cabras, que mostrou-se eficaz em induzir um intenso quadro trombocitopênico em coelhos. Análises histopatológicas indicam que a ausência das plaquetas não diminuiu a formação de trombos intravasculares na área da derme sob a ação do veneno. O desenvolvimento da lesão dermonecrótica em coelhos injetados com o veneno

loxoscélico mostrou-se mais intenso naqueles depletados de plaquetas do que nos animais com número normal de plaquetas, constatável pelo desenvolvimento de maiores áreas de equimose e das escaras necróticas. Os resultados semelhantes dos níveis plasmáticos do fator de von Willebrand, dos tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada, assim como dos testes de fagocitose por polimorfonucleares isolados do sangue periférico, entre os coelhos trombocitopênicos e aqueles com contagem normal de plaquetas, evidenciam que não houve alterações expressivas nas células endoteliais, no sistema da coagulação e na capacidade fagocítica via C3b dos polimorfonucleares do sangue periférico. Os presentes resultados mostram que o veneno loxoscélico *in vitro* é capaz de elicitar em plaquetas humanas e de coelhos as respostas de agregação, de adesão e de ativação. Por fim, as diferenças no desenvolvimento da lesão, constatadas entre o animal trombocitopênico e o animal normal, evidenciam que a plaqueta é um fator importante para controlar a expansão e a gravidade da lesão dermonecrótica induzida em coelhos pelo veneno loxoscélico.

Palavras-chave: *Loxosceles*. Plaquetas. Agregação. Adesão. Dermonecrose.

ABSTRACT

TAVARES, F. L. **Contribution to the study of the *in vitro* action induced by the venom of the brown spider, *Loxosceles gaucho*, on human and rabbit platelets. Platelet participation in the dermonecrotic lesion experimentally induced in rabbits by the loxoscelic venom.** [Contribuição ao estudo da ação *in vitro* do veneno da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, sobre plaquetas humanas e de coelho. Participação das plaquetas na dermonecrose induzida experimentalmente em coelhos pelo veneno loxoscélico]. 2007. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Venoms from *Loxosceles* spiders exhibit a wide range of activities on different cells, tissues and systems, being specially evident their ability to cause a dermonecrotic lesion. In a previous paper, we showed that *Loxosceles gaucho* spider venom induces intense thrombocytopenia in rabbits. Thus, in the present study, we firstly aimed to evaluate the *in vitro* interaction between human and rabbits platelets and *L. gaucho* venom and its major component, the sphingomyelinase fraction. Secondly, we investigated the platelet role in the dermonecrotic lesion formation using an experimental model of thrombocytopenia in rabbits. Both total venom and its sphingomyelinase fraction stimulated *in vitro* aggregation *per se* in platelet-rich plasma from both species, but a more intense response was obtained with human platelets. Taking into consideration that neither total venom nor its sphingomyelinase fraction induced aggregation of washed platelets, it can be deduced that one or more plasma components are necessary to induce this response. Moreover, LDH data indicated that total venom, at least at the concentration levels used in this study, cannot induce platelet lysis. Regarding platelet activation, total venom was able to increase the expression of LIBS1 on both human and rabbit platelet surface and P-selectin on only rabbit platelet surface. However, the sphingomyelinase fraction did not increase the expression of any marker of platelet activation, at least in the experimental conditions used in this study. Another *in vitro* study showed that both total venom and its sphingomyelinase fraction induce an increase in human and rabbit platelet adhesion, with the sphingomyelinase fraction exhibiting a dose-dependent response. For the study using an animal model of thrombocytopenia, it was necessary to previously produce goat antibodies against rabbit platelets, which showed to be effective to induce an intense thrombocytopenia in rabbits. Histopathological analysis of venom-induced dermic tissue lesion indicated that platelet absence does not decrease the

formation of intravascular thrombi in the injured area. Nonetheless, bigger areas of equimosis and necrotic scabs could be observed in the dermonecrotic lesion of rabbits injected with loxoscelic venom and depleted of platelets. In the different groups, plasma levels of von Willebrand factor, prothrombin and activated partial thromboplastin times, and data from phagocytosis tests using polymorphonuclear cells isolated from rabbit peripheral blood were similar comparing thrombocitopenic rabbits with those exhibiting normal platelet count; therefore, we can deduce that there is not any expressive alteration in endothelial cells, coagulation system and phagocytic ability of polymorphonuclear leukocytes via their complement receptor C3b. In conclusion, the loxoscelic venom is able to unchain *in vitro* different mechanisms leading to adhesion, activation and aggregation of both human and rabbit platelets. Furthermore, due to differences in the dermic lesion patterns between thrombocitopenic and normal animals, we can conclude that platelets must play a key role in controlling the expansion and severity of the dermonecrotic lesion induced in rabbits by *L. gaucho* venom.

Key words: *Loxosceles*. Platelet. Aggregation. Adhesion.

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 ANIMAIS	34
3.2 OBTENÇÃO DO VENENO	34
3.3 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ESFINGOMIELINÁSICA A PARTIR DO VENENO OBTIDO	35
3.4 AÇÃO <i>IN VITRO</i> DO VENENO DE <i>LOXOSCELES GAUCHO</i> E DA SUA FRAÇÃO ESFINGOMIELINÁSICA SOBRE AS PLAQUETAS	34
3.4.1 Coleta sanguínea para obtenção das plaquetas	35
3.4.2 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e da suspensão de plaquetas lavadas (SPL)	36
3.4.3 Ensaio de agregação plaquetária	36
3.4.4 Liberação de lactato desidrogenase (LDH)	37
3.4.5 Ensaio de adesão plaquetária	38
3.4.6 Ativação plaquetária - Citometria de fluxo das plaquetas	38
3.5 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	40
3.5.1 Imunização das cabras	41
3.5.2 Purificação de anticorpos IgG do soro de cabras	41
3.5.3 Determinação dos títulos de anticorpos anti-plaqueta por ELISA	42
3.5.4 Teste para a presença de pirogênio na IgG purificada	42
3.5.5 Padronização da quantidade de IgG a ser administrada para indução e manutenção da trombocitopenia - Número de leucócitos, de polimorfonucleares e de mononucleares nos animais trombocitopênicos	43
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
3.6.1 Injeção i.d. do veneno de <i>L. gaucho</i> em coelhos trombocitopênicos e em coelhos com contagem normal de plaqueta	
3.6.2 Análise da área da lesão	45

3.6.3 Fagocitose via C3b por polimormofonucleares de coelho	46
3.6.4 Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada	47
3.6.5 Dosagem de vonWillebrand	47
3.6.6 Coloração histológica de fibrina-plaqueta	48
3.6.7 Imuno-histoquímica para marcação de GPIIb-IIIa	49
3. 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS	51
4.1 RESULTADOS DOS ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	51
4.1.1 Agregação plaquetária em suspensão de plaqueta lavada (SPL)	51
4.1.2 Agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP)	51
4.1.3 Atividade de LDH	53
4.1.4 Ativação plaquetária	54
4.1.5 Adesão plaquetária	56
4.2 RESULTADOS DA OBTENÇÃO DO ANTICORPO	59
4.2.1 Títulos de IgG no soro caprino.....	59
4.2.2 Teste para verificação da presença de pirogênio na IgG purificada	61
4.2.3 Padronização da quantidade de IgG a ser administrada para indução e manutenção da trombocitopenia - Número de leucócitos, de polimorfonucleares e de mononucleares nos animais trombocitopênicos	61
4.3 RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS COM COELHOS	63
4.3.1 Hemograma dos animais experimentais	63
4.3.2 Fagocitose por polimorfonucleares	66
4.3.3 Níveis plasmáticos de vWF	68
4.3.4 Tempo de protrombina e tempo de protrombina ativada	69
4.3.5 Análise macroscópica da lesão	70
4.3.6 Análise histopatológica da lesão e participação das plaquetas	72
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, pertencentes à família *Sicariidae* (PLATNICK et al., 1991), podem ser encontradas em diferentes latitudes, adaptadas a distintas condições ambientais das zonas de clima tropical e temperado do globo terrestre. Representantes deste gênero estão espalhados pelos cinco continentes, e relatos de acidentes envolvendo estas aranhas com seres humanos têm sido registrados em diferentes regiões do planeta, como no leste europeu (BOGDAN et al., 2005), Oriente Médio (DYACHENKO et al., 2006), África (NEULANDS; ATKINSON, 1990) e Oceania (HOGAN et al., 2004). No continente americano, provavelmente se encontre a maior diversidade de espécies deste gênero, sendo relatadas cerca de 50 somente na América do Norte (GOMEZ et al., 2001). Em algumas regiões do Brasil, Chile e Peru, os acidentes provocados por aranhas do gênero *Loxosceles* constituem um significativo problema de saúde pública (SCHENONE, 2003; DA SILVA et al., 2004; HOGAN et al., 2004).

A alta casuística dos acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* em certas regiões do globo, juntamente com a ampla distribuição mundial deste gênero, vêm gerando um interesse científico crescente em torno deste gênero, que certamente representa um dos mais importantes grupos de aranhas em todo o mundo em termos de importância médica (HOGAN et al., 2004). É bastante provável que a proliferação exacerbada destas aranhas em algumas regiões do globo esteja relacionada com mudanças e desequilíbrios ambientais. Em algumas destas regiões, onde a casuística de acidentes com humanos é alta, campanhas públicas de esclarecimento à população têm sido promovidas com o objetivo de controlar a alta infestação intradomiciliar, tentando assim minimizar o número destas ocorrências. Esse é, por exemplo, o caso da região metropolitana de Curitiba, onde se verificou nas últimas décadas um expressivo aumento de acidentes com aranhas da espécie *Loxosceles intermedia* (DA SILVA et al., 2004). No Brasil, além da espécie *L. intermedia*, outras duas espécies apresentam importância médica: *L. laeta*, encontrada em focos isolados nos estados do sul do país; e *L. gaucho*, espécie predominante no estado de São Paulo, e objeto do presente estudo.

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde (2001) confirmam a importância médica dos acidentes envolvendo espécies deste gênero, registrando um aumento

significativo no número de casos notificados ao longo das últimas décadas. Nos três primeiros anos da década de 90, foram registrados mais de 6.000 casos, correspondendo a aproximadamente metade dos acidentes araneídicos notificados no país neste período. Uma década após, o número de acidentes notificados causados por *Loxosceles* aumentou expressivamente, perfazendo em todo o país um total de 34.601 casos registrados somente na primeira metade desta década. Os dados mais recentes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinam – do Ministério da Saúde (2006) (<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet>) mostram que no ano de 2006 foram registrados 6.361 casos causados por aranhas deste gênero, o que representa um percentual de 38 % do total das ocorrências causadas por aranhas. O número de acidentes araneídicos notificados no Brasil sofreu uma abrupta elevação nos primeiros anos da presente década, e os casos envolvendo o gênero *Loxosceles* têm acompanhado a intensidade deste aumento.

A aranha do gênero *Loxosceles* (Figura 1), popularmente conhecida no Brasil como aranha marrom, é pequena e apresenta, quando adulta, comprimento de 1 a 2 cm de corpo (medida do cefalotórax e abdômen) e até 5 cm de envergadura, considerando-se a extremidade de uma perna a outra, sendo a fêmea maior do que o macho. Com aspecto frágil, é comum encontrá-la recolhida e com aspecto de morta, aparentando perda de tônus nas pernas. Apresenta geralmente uma coloração corporal uniforme, que varia de marrom amarelado a castanho, o que justifica o nome popular.

De modo geral, as aranhas deste gênero possuem hábitos preferencialmente noturnos e se adaptam a lugares secos, quentes e escuros. Alocam-se sob pedras, cascas de árvores, em fendas de barrancos e cavernas. Sua teia possui trama irregular, formando um tufo esbranquiçado no local em que é construída. Na região peridomiciliar, podem ser encontradas em pilhas de tijolos, telhas e entulhos em geral. Quando a proliferação ambiental destas aranhas é muito grande, é freqüente a infestação do ambiente domiciliar, uma vez que estes aracnídeos adaptam-se com facilidade atrás de móveis, quadros, rodapés soltos, cantos de parede e outros locais pouco acessíveis à limpeza (SEZERINO et al., 1998).

De comportamento pouco agressivo, espécimes de *Loxosceles* tendem a fugir frente à ameaça. Os acidentes ocorrem principalmente quando uma aranha oculta em vestimenta,

calçado, toalha ou roupa de cama é inadvertidamente comprimida contra a pele, um ocorrido também comum durante o sono da vítima, o que é relatado em considerável número de casos (SCHENONE et al., 1989; CARDOSO et al., 1990). Em aproximadamente metade dos relatos de acidentes, a aranha não é notada, e menos de 10% dos acidentados levam-na ao atendimento médico para uma possível identificação de gênero/espécie (RIBEIRO et al., 1990).



Figura 1. Exemplar de fêmea adulta da espécie *Loxosceles gaucho*.

Embora cada espécie possua peculiaridades na composição do veneno e pequenas diferenças moleculares em seus principais componentes (GUILHERME et al., 2001), as características gerais do acidente loxoscélico são mantidas, independentemente da espécie envolvida.

O loxoscelismo é a patologia que resulta do acidente com estas aranhas e tem como característica marcante o desenvolvimento de uma lesão dermonecrótica no local da picada. A evolução da dermonecrose configura a forma cutânea do loxoscelismo, que é a forma clássica desta patologia e que ocorre na maioria dos casos. Recentemente, (2003) propôs uma subclassificação do loxoscelismo cutâneo, denominando de loxoscelismo cutâneo edematoso aqueles casos em que não ocorre a evolução da dermonecrose, mas somente a formação de uma região com edema, com graus variados de comprometimento tecidual próximo ao local da picada. A outra forma desta patologia, denominada de forma cutâneo-visceral do loxoscelismo, além da lesão no local da picada, apresenta severas manifestações sistêmicas, como hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada, que podem conduzir a um quadro de insuficiência renal e ao óbito. A forma cutâneo-visceral tem uma casuística reduzida, perfazendo de 1 a 13 % do total de casos registrados, que varia conforme a região do país e a espécie predominante (MINISTÉRIO DA SAÚDE (2001).

Na forma cutânea do loxoscelismo, podem ocorrer graus variados de intensidade dos sinais clínicos locais, como eritema e edema, acompanhados de sintomatologia também variada, sem que necessariamente ocorra a formação da dermonecrose. A gravidade da lesão, e conseqüentemente dos sintomas, pode estar relacionada a uma série de fatores, como tamanho, idade e sexo da aranha, quantidade de veneno injetado, entre outros. Também podem influenciar na formação e na intensidade da lesão dermonecrótica os fatores intrínsecos ao indivíduo, ainda pouco conhecidos e estudados, ou ainda o local da picada. Dependendo da sua profundidade, a lesão pode atingir tecidos mais profundos e chegar até a musculatura subjacente, existindo relatos de acidentes em humanos com quadro clínico e laboratorial de rabdomiólise (FRANCA et al., 2002). Em seu modo clássico de surgimento e de evolução, a formação da lesão dermonecrótica ocorre logo nos primeiros dias após o acidente. Comumente, eritema e edema iniciais progridem para uma mácula equimótica, geralmente envolvendo uma área isquêmica; vesículas e bolhas de conteúdo hemorrágico ou sero-hemorrágico podem se formar. Entre a primeira e a segunda semanas, delimita-se uma área necrótica de cor escura, onde se forma uma crosta negra que, à medida que seca e se contrai, desprende-se da pele. A resolução da ferida, que não

raro se apresenta ulcerosa, pode ser longa, dependendo da sua extensão, profundidade e ocorrência de infecções secundárias (CARDOSO et al., 1990; SEZERINO et al., 1998).

Em análises histopatológicas, é possível observar um intenso quadro inflamatório local, com presença expressiva de células inflamatórias, principalmente células polimorfonucleares. A presença intensa destas células na região perivascular caracteriza um quadro de vasculite aguda, formado logo nas primeiras horas do envenenamento. O edema local pode ser evidenciado, assim como a desorganização das fibras colágenas. A perda da integridade vascular pode ser notada pela vacuolização e despreendimento das células endoteliais, bem como pela própria ruptura dos vasos de pequeno e médio calibre, o que está associado com um grave quadro de hemorragia local, de fácil constatação. A formação de trombos intra e extravasculares pode ser notada em toda a extensão da lesão dermonecrotica (YIANNIAS; WINKELMANN, 1992; OSPEDAL et al., 2002; TAVARES et al., 2004).

O veneno loxoscélico possui em sua composição uma ampla gama de componentes. O isolamento e a caracterização de suas toxinas ao longo das últimas décadas têm confirmado a presença de fosfatases alcalinas, esterases, ribonucleotidasas, desoxiribonucleotidasas e uma variedade de proteases. O principal componente do veneno loxoscélico, descrito em todas as espécies de *Loxosceles* estudadas até o momento, pertence ao grupo das enzimas que possuem atividade esfingomielinásica, ou seja, que possuem a capacidade de hidrolisar a molécula de esfingomielina, um importante fosfolípide constitutivo da membrana celular (FUTRELL, 1992; DA SILVA et al., 2004; HOGAN et al., 2004)

O perfil eletroforético em gel de SDS é muito similar quando se avalia o veneno total das principais espécies de *Loxosceles* com importância médica no Brasil, no caso as espécies *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. As principais bandas encontradas no veneno de *L. laeta* estão presentes na faixa entre 32 e 35 kDa de massa molecular, bastante similar àquelas encontradas em *L. gaucho* e *L. intermedia*, com massa molecular variando entre 33 e 35 kDa (BARBARO et al., 1994). O alto percentual de similaridade das sequências do N-terminal destas toxinas nas três principais espécies brasileiras sugere fortemente que estas enzimas seriam isoformas de uma mesma proteína (BARBARO et al., 1996). Mais recentemente, com estudos de espectrometria de massa, foram encontradas no veneno de *L.*

gaucho duas proteínas com massas muito similares, de 31,4 e 31,6 kDa (denominadas respectivamente de Loxnecrogina A e Loxnecrogina B), que se mostraram capazes de induzir a dermonecrose em coelhos (CUNHA et al., 2003). A Loxnecrogina A, por sua vez, apresentou um alto grau de similaridade com a proteína recombinante LiD1, obtida a partir do veneno de *L. intermedia* (KALAPOTHAKIS et al., 2002).

Algumas importantes atividades do veneno, como a degradação sobre a fibronectina e o do fibrinogênio, têm sido atribuídas a enzimas com atividade metaloproteásicas. No veneno de *L. intermedia* foram mostradas as atividades fibronectinolítica e fibrinogenolítica de enzimas com massa entre 20-28 kDa (denominada de Loxolisinas A), e ainda a atividade gelatinolítica de proteínas com massa entre 30-32 kDa (chamada de Loxolisinas B). Serinoproteases, por sua vez, têm sido também encontradas nos venenos loxoscélicos. No veneno de *L. intermedia* foram identificadas duas serinoproteases de 85 e 95 kDa, que mostraram respectivamente atividades gelatinolítica e caseinolítica, sendo essa última uma atividade menos expressiva. Ambas são sugeridas como responsáveis pela difusão do veneno e pela progressão da área lesada (FEITOSA et al., 1998; VEIGA et al., 1999). Um possível efeito sinérgico entre estes componentes foi proposto por VEIGA et al. (2000), que sugeriu que algumas proteinases poderiam desnaturar parcialmente o colágeno nativo; e em seguida, as gelatinases complementariam essa degradação. De modo geral, o efeito fibrinogenolítico e a atividade metaloproteásica são relatados nos venenos das espécies de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (DA SILVA et al., 2004).

A ação complexa do veneno loxoscélico pode ser melhor compreendida quando se analisa a ação de sua principal toxina, a esfingomielinase D. Presente nos diferentes venenos loxoscélicos estudados até o momento, esse componente corresponde a enzimas de massas moleculares muito próximas entre si e que têm sido constatadas como isoformas de uma mesma enzima. A quebra da esfingomielina pela esfingomielinase pode favorecer, a partir da formação de ceramida, a subsequente geração de dois subprodutos fosfolipídicos envolvidos em importantes fenômenos biológicos, que são a de 1-fosfato de ceramida e a 1-fosfato de esfingosina (MARCHESINI; HANNUN, 2004). Além disso, a ação da esfingomielinase pode ser ainda mais ampla. Recentemente, LEE & LINCH (2005) mostraram que uma enzima de 34 kDa, clonada a partir do veneno de *L. reclusa*, foi capaz de hidrolisar, além da esfingomielina, uma ampla gama de lipídeos, como lisofosfolípidos,

lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico cíclico. Estudando o veneno de *L. laeta*, VAN MEETEREN et al. (2004) também constataram que uma enzima clonada a partir deste veneno, caracterizada anteriormente como uma esfingomielinase D (FERNANDES-PEDROSA et al., 2002) et al., 2002), apresentou atividade de hidrólise sobre a lisofosfatidilcolina (LPC), gerando desta forma a molécula de ácido lisofosfatídico (LPA). Esse fosfolípide é atualmente reconhecido como um mediador lipídico pleiotrópico que atua diretamente sobre determinados receptores, relacionados com a sinalização intracelular via proteína G, e que são encontrados em diferentes tipos celulares (CHUN et al., 1999; MOOLENAAR, 1999). Assim, através da geração do ácido lisofosfatídico, a esfingomielinase pode estar envolvida com fenômenos relacionados à agregação plaquetária, hipermeabilidade endotelial e com a resposta inflamatória (ROTHER et al., 2003; HASERUCK et al., 2004).

Os esfingolípides foram considerados, por muitas décadas, lipídeos inertes da membrana celular. A descoberta da inibição da proteína quinase C pela esfingosina conduziu à reformulação conceitual do papel destes lipídeos na biologia celular, na transdução e na sinalização celular (HANNUN; OBEID, 1997; PENA et al., 1997). Outros esfingolípides, incluindo a esfingosina-1-fosfato, a esfingosilfosforilcolina, a 1-fosfato ceramida e a própria ceramida, têm sido propostos como lipídeos bioativos e como moléculas que atuam como segundo mensageiro (SPIEGEL et al., 1996; HANNUN; LUBERTO, 2000). Assim como a ação do diacilglicerol gerado por uma fosfolipase C específica para fosfoinositídeo, a ceramida é um produto regulado pela via da esfingomielina e pode modular uma variedade de eventos celulares, que englobam desde a proliferação e diferenciação celular até os fenômenos de crescimento tecidual e apoptose (HANNUN; LUBERTO, 2000; MARCHESINI; HANNUN, 2004). Assim, é possível considerar que o amplo raio de ação das esfingomielinases é emblemático da intricada patogênese do loxoscelismo.

Ao longo das últimas décadas, o conjunto dos estudos realizados com os venenos loxoscélicos mostra a complexidade e o caráter multifatorial do intrincado mecanismo de ação presentes na patogênese do loxoscelismo. Atualmente se sabe que diferentes sistemas e diferentes tipos celulares estão envolvidos no desencadeamento e na progressão da lesão dermonecrótica. Estudando o efeito do veneno bruto de *L. intermedia* sobre células

endoteliais de coelho, (VEIGA et al., 2001) evidenciaram um processo de vacuolização que ocorre nas células endoteliais, associado com a perda da integridade do vaso, além da degradação de proteoglicanas e da perda de adesividade *in vitro*, notadas também em células endoteliais. Ainda nestas células, o veneno de *L. reclusa* é capaz de promover um aumento da expressão de E-selectina, além de aumentar a síntese de IL-8 e de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (PATEL et al., 1994). GOMEZ et al. (1999) verificaram que, além da IL-8, culturas de células endoteliais e epiteliais expostas ao veneno loxoscélico secretavam, de modo dose-dependente, quantidades expressivas de proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1) e de ativar o oncogene α relacionado ao crescimento (GRO α). Esse mesmo grupo mostrou ainda a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em cultura de queratinócitos exposta ao veneno de *L. deserta* (DESAI et al., 2000) e também a produção de quimiocinas dependentes do fator NF-kappa- β por células endoteliais (DESAI et al., 1999). Trabalhando com a espécie brasileira *L. gaucho*, MÁLAQUE et al. (1999) relataram a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em cultura de queratinócitos expostos ao veneno desta espécie.

A ativação do sistema complemento e de seus efeitos deletérios pelos venenos loxoscélicos parece ser explicável, ao menos em parte, pela interação entre as componentes que apresentam atividade esfingomielinásica e a membrana celular. A ocorrência da hemólise intravascular, o principal fenômeno associado às manifestações sistêmicas da forma cutâneo-visceral do loxoscelismo em humanos, parece estar estreitamente relacionada com a ativação do sistema complemento. A hemólise induzida *in vitro* em eritrócitos humanos, pela fração de 35 kDa purificada do veneno de *L. intermedia*, foi sugerida como sendo dependente da ativação da via alternativa do complemento, uma vez que o pré-aquecimento do soro normal humano não permitiu a indução da hemólise (TAMBOURGI et al., 1995). O componente de 35 kDa, com atividade esfingomielinásica, foi sugerido como elemento central na ativação dos componentes hemolíticos do complemento, ao favorecer a clivagem de glicoforina da membrana eritrocitária (TAMBOURGI et al., 2000). Na tentativa de compreender o envolvimento do sistema complemento nos fenômenos locais associados ao desenvolvimento da lesão dermonecrotica, VAN DEN BERG et al., (2002) avaliaram em cultura de células

endoteliais a clivagem, por toxinas presentes no veneno *L. intermedia*, de uma proteína de membrana que atua como cofator regulatório do complemento (MCP/CD46) e também de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I, presentes na superfície celular. Ambas as proteínas de membrana sofreram clivagem pela ativação de uma metaloprotease da família das ADAM-lisinas, que por sua vez foi ativada pela toxina do veneno. A resultante diminuição na expressão destas proteínas regulatórias do complemento acarretou o aumento da lise mediada via complemento.

Um papel de destaque na formação da dermonecrose tem sido atribuído aos leucócitos polimorfonucleares. Em um estudo clássico, SMITH e MICKS (1985) observaram que coelhos tratados com mostarda nitrogenada, que induz granulocitopenia, não desenvolveram a lesão dermonecrótica induzida do veneno de *L. reclusa*. Em estudos *in vitro* de migração neutrofílica na década de 70 e 80, foi mostrado que o veneno loxoscélico não apresenta uma ação direta sobre neutrófilos enquanto promotor da migração leucocitária (MAJESKI et al., 1977; BABCOCK et al., 1986). Investigando a ação direta do veneno sobre neutrófilos humanos, PATEL et al. (1994) encontraram uma resposta desregulada destes leucócitos frente à exposição ao veneno de *L. reclusa*. No entanto, este veneno desencadeia reações em outras células, como a endotelial, e em substratos específicos, como os componentes da matriz extracelular, que podem sinalizar o início e a progressão da resposta inflamatória e, desta forma, influenciar, indiretamente, o fenômeno de recrutamento local das células polimorfonucleares. A presença das células polimorfonucleares nos tecidos atingidos pela ação do veneno é intensa, como mostram análises histopatológicas realizados em estudos experimentais (SUNDERKOTTER et al., 2001; OSPEDAL et al., 2002; TAVARES et al., 2004) e também em biópsias humanas (YIANNIAS; WINKELMANN, 1992).

Células anucleadas, as plaquetas são geradas a partir da fragmentação dos megacariócitos na medula óssea, e são os primeiros elementos sangüíneos que reagem a uma lesão endotelial e à conseqüente exposição da matriz subendotelial, quando então formam o tampão hemostático primário (DE GAETANO, 2001). As plaquetas são os componentes celulares envolvidos de forma direta e ativa com a hemostasia sangüínea. Além do reconhecido e clássico papel exercido nos processos em que o equilíbrio hemostático é rompido, as plaquetas têm sido investigadas por participarem de fenômenos

fisiológicos e patológicos diversos, como na inflamação, na neovascularização, na apoptose e nos processos neoplásicos e metastáticos (GUPTA; MASSAGUE, 2004; ZWAAL et al., 2005; STEINHUBL, 2007).

De modo geral, as plaquetas apresentam, quando não estão ativadas, uma forma discóide em cortes transversais, e circular em cortes longitudinais. Morfologicamente, são identificáveis como organelas plaquetárias os corpos densos, os grânulos α , os lisossomos, as mitocôndrias, o sistema de canais abertos, o sistema tubular denso, o citoesqueleto e os microtúbulos e o sistema tubular denso. As diferenças entre espécies podem existir no volume, contagem e morfologia. As plaquetas circulantes em coelhos variam em volume entre 3,0 e 5,0 fL, e na espécie humana entre 6,0 e 8,0 fL (MEYERS et al., 1982; GALVEZ et al., 1986). Em compensação, o número de plaquetas no sangue total normalmente é maior em coelhos (apesar da grande variação nesta espécie, dependendo da raça e da linhagem), oscilando entre 300 e 1000x10⁹/L, maiores que os valores de referência para a espécie humana, que é de 150 a 400 x10⁹/L, segundo DACIE & LEWIS (1991). Morfologicamente, plaquetas humanas e de coelhos são similares quando observadas pela microscopia eletrônica de transmissão. Talvez o único detalhe morfológico que permita diferenciar as plaquetas nestas duas espécies, além do tamanho, seja exclusivamente a quantidade de corpos densos plaquetários, cujo número é superior nas plaquetas de coelho (PACHMANN et al., 2001).

A diversidade de substâncias encontradas nas principais organelas plaquetárias mostra a abrangência e a complexidade do papel destas células. O conteúdo dos lisossomos, por exemplo, presentes nas plaquetas sob a forma de pequenas vesículas (0,18 a 0,25 μ m), é composto por diversas enzimas, como a hidrolase, a fosfatase ácida, a α -glicuronidase, a N-acetilglicosaminidase, a arilsulfatase, as catepsinas, a heparitinase, a elastase, a collagenase, entre outras (HAWIGER, 1989). Os corpos densos, por sua vez, contêm serotonina, histamina, um depósito não metabólico de adenina (ATP e ADP) e guanina (GTP e GDP), cálcio, magnésio e pirofosfatos (HAWIGER, 1989; MCNICOL; ISRAELS, 1999). Já os grânulos α , que são as organelas mais numerosas do citoplasma plaquetário, possuem dois tipos de proteínas de estoque. O primeiro deles são proteínas quase que exclusivamente sintetizadas pelos megacariócitos, tais como o fator plaquetário 4 (PF-4) e a β -tromboglobulina (β TG). O segundo tipo são proteínas idênticas àsquelas presentes no

plasma, mas que são sintetizadas em outras células e captadas por endocitose de substâncias plasmáticas, tais como a albumina, o fator V da coagulação, o fator de von Willebrand (vWF), a trombospondina, a fibronectina, o fibrinogênio, a α_2 -antitripsina, a imunoglobulina G (IgG), a α_2 -antiplasmina, a α_2 -macroglobina, o cininogênio de alto peso molecular, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator transformador de crescimento β , o inibidor do ativador de plasminogênio do tipo tecidual (PAI-1) e o C1-inibidor (HAWIGER, 1989; HARRISON et al., 1990).

O papel da plaqueta como agente da manutenção do equilíbrio hemostático pode ser entendido através de quatro fenômenos fundamentais, que estão relacionados à expressão da atividade funcional plaquetária: a adesão, a agregação, a contração e a secreção. Na maioria dos processos fisiológicos e patológicos envolvendo a plaqueta, entre a adesão e os demais fenômenos acima citados está o processo de ativação plaquetária, fundamental para que os dispositivos celulares sejam acionados e o dispositivo celular para que as plaquetas possam desempenhar o seu papel no restabelecimento do equilíbrio hemostático.

O conceito de adesão, a princípio, está relacionado à interação entre as plaquetas e a matriz subendotelial, nos locais onde ocorre a injúria à célula endotelial. Os principais tipos de colágeno presentes nos vasos sanguíneos - tipos I, III e VI - produzem, por meio de receptores distintos, a resposta de adesão. A ligação do colágeno com os receptores de adesão, assim como a ligação de outros agonistas plaquetários aos seus receptores específicos presentes na superfície plaquetária - trombina ao PAR 1, 3 e 4; ADP ao P2Y₁, P2Y₁₂; serotonina e tromboxano A₂ (TXA₂) aos seus respectivos receptores; entre outros - é capaz de promover o fenômeno de ativação plaquetária, no qual ocorrerão uma série de eventos de sinalização intracelular que culminarão em modificações estruturais e funcionais na plaqueta (ANDREWS et al., 2003).

No caso da ativação pelo colágeno, a GPVI é um importante receptor deste agonista, que está acoplado a um receptor de baixa afinidade para a IgG, o FcRIIa, que estimula uma fosforilação rápida e intensa da tirosina quinase Syk. Esta por sua vez interage com os ITAM (motivos de ativação dos imunoreceptores baseados na tirosina) presentes em uma ou mais cadeias destes receptores. Nas plaquetas estimuladas pelo colágeno, a cadeia γ do receptor Fc e a Syk são essenciais para a seqüência do processo de sinalização intracelular que culminarão na agregação e secreção plaquetárias induzidas por este agonista. Na

seqüência, a ativação da Syk conduz à fosforilação da PLC γ 2, que então hidrolisa o 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃). Este último contribui para a mobilização do aumento da concentração do Ca²⁺⁺ intracelular, por meio tanto da liberação, dos estoques existentes no sistema tubular denso plaquetário, como do influxo do cálcio extracelular. Por sua vez, a formação de DAG ativa a proteína quinase C (PKC). O aumento do cálcio intracelular regula muitos eventos que conduzem à agregação plaquetária, incluindo a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) citoplasmática, que hidrolisa os fosfolípidos de membrana, gerando ácido araquidônico para a síntese de tromboxano A₂ (TXA₂). Este, por sua vez, desempenha um papel de retroalimentação positiva na agregação plaquetária induzida pelo colágeno, ao ligar-se a receptores acoplados a proteínas G, responsáveis por outra seqüência importante de sinalização intracelular (WATSON et al., 2005).

A trombina é certamente o agonista plaquetário mais potente e induz sinalização intracelular, ao menos em parte, através de receptores ativados por proteases (PAR) ligados a proteínas G. Estes receptores, que pertencem à família dos receptores de sete domínios transmembrânicos, convertem um evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembrânico. A trombina se liga ao PAR1 e cliva o seu exodomínio aminoterminal na posição Arg₄₁, liberando um peptídeo e expondo um ligante oculto deste receptor, que por sua vez é capaz de auto-ativar este receptor (COUGHLIN, 2005). A trombina apresenta outros receptores - como o PAR3, PAR4 e o complexo GPIb-IX-V - na superfície plaquetária. Pelo que se sabe, a interação cooperativa entre os receptores plaquetários para a trombina representa um importante mecanismo de ativação plaquetária.

No aspecto estrutural, a ativação plaquetária resulta em mudanças internas e externas na plaqueta. Um dos mais expressivos destes fenômenos na ativação plaquetária é o aumento da exposição da glicoproteína Iib-IIIa, também denominada de α Iib β III, cuja conformação estrutural é modificada na plaqueta ativada de tal modo a aumentar a sua capacidade de ligação ao fibrinogênio. O fibrinogênio é o principal ligante da GPIIb-IIIa e a sua ligação a duas destas proteínas, localizadas em plaquetas diferentes, permitirá a ocorrência da agregação plaquetária (BERNDT et al., 2001; SAVAGE et al., 2001). As glicoproteínas Iib (CD41) e a IIIa (CD61) formam um complexo estequiométrico de 1:1 dependente de cálcio, não covalentemente associado à membrana plaquetária, que

respondem por cerca de 3% das proteínas plaquetárias totais e por cerca de 17 % da massa das proteínas da membrana plaquetária em humanos. O complexo GPIIb-IIIa pertence à superfamília das integrinas, que é uma família de receptores expressos na superfície de todas as células. Os sinais mediados pelas integrinas regulam a interação célula-célula e célula-matriz, eventos primordiais em uma grande variedade de fenômenos biológicos. A formação de um complexo entre as duas glicoproteínas é fundamental para a funcionalidade deste complexo. Aparentemente, a actina e as proteínas associadas a ela reprimem os domínios intracitoplasmáticos de GPIIb-IIIa em estado de repouso, que são liberados durante a ativação plaquetária, uma vez que as proteínas do citoesqueleto se envolvem com a mudança de forma. Deste modo, a GPIIb-IIIa sofre uma modificação no seu complexo estrutural e aumenta sua afinidade de ligação ao fibrinogênio (BENNETT, 2005).

O fluxo de informações que causa a modificação do estado de repouso da GPIIb-IIIa para o seu estado de ativação, quando ela se torna capaz de unir-se a ligantes, é regulado por uma plêiade de eventos intracelulares. Após a ocupação do sítio de ligação das integrinas, a informação desta ligação é enviada através da membrana plasmática para o interior do citoplasma, por um processo conhecido como sinalização de fora para dentro, evento que promove o agrupamento das integrinas na superfície celular e a fixação dos domínios intracelulares das integrinas ao citoesqueleto plaquetário. A sinalização de fora para dentro também está relacionada com diversas funções críticas à fisiologia plaquetária, como a geração de TXA_2 , a ativação da calpaína, a fosforilação de proteínas, o metabolismo fosfolipídico, a microvesiculação plaquetária e a secreção de grânulos α e corpos densos. Tanto a ativação de dentro para fora como a de fora para dentro têm papéis complementares na regulação da atividade da GPIIb-IIIa (WATSON et al., 2005).

A mudança na estrutura quaternária da GPIIb-IIIa, quando ativada, permite a abertura do seu sítio de ligação para a entrada de ligantes macromoleculares. (SANTORO; SANO-MARTINS, 2004) Posteriormente à ligação do fibrinogênio ou de suas seqüências de reconhecimento à GPIIb-IIIa, outras mudanças estruturais se sucedem nestas glicoproteínas, de modo que surjem novos epítomos - denominados epítomos induzidos pela união de algum ligante (LIBS) (CALVETE, 1994)). A exposição de alguns destes epítomos tem sido usada como marcador do estado de ativação plaquetária (SANTORO; SANO-MARTINS, 2004; TOMER, 2004). Além de seu papel principal como receptor do

fibrinogênio, a GPIIb-IIIa também pode se ligar a outras proteínas adesivas encontradas no plasma ou no subendotélio, como a fibronectina, o vWF e a vitronectina. A ligação desta integrina tanto ao fibrinogênio como ao vWF podem levar à agregação plaquetária, mas devido à sua alta concentração no plasma, o fibrinogênio é o ligante fisiológico mais importante da GPIIb-IIIa (BENNETT, 2005).

Como mencionado anteriormente, a ativação plaquetária causa modificações substanciais do citoesqueleto plaquetário, que são fundamentais para a mudança de forma, adesão, agregação e secreção destas células. Tais modificações têm um papel importante no movimento dos grânulos plaquetários e na exocitose (REED et al., 2000). Quando ocorre a exocitose plaquetária, os grânulos se fundem com a membrana citoplasmática ou com o sistema de canais abertos para secretarem seu conteúdo no meio extracelular, e durante o processo de coalescência dos grânulos de secreção com a membrana plaquetária, diversas glicoproteínas que estão presentes exclusivamente na membrana interna destes grânulos se tornam expressas na superfície da plaqueta. Dentre estas, pode-se destacar a P-selectina, o CD63, LAMP-1 e o CD154 (MICHELSON; FURMAN, 1999).

A P-selectina, também conhecida como CD62P, GMP-140 e PADGEM, é uma glicoproteína que existe exclusivamente dentro dos grânulos α das plaquetas quiescentes e em células endoteliais não estimuladas. A expressão desta proteína na superfície plaquetária tem sido utilizada como marcador da ativação plaquetária (JURK; KEHREL, 2005; STEINHUBL; MOLITERNO, 2005). Tanto nas células endoteliais como nas plaquetas, a expressão da P-selectina intermedeia a adesão de monócitos e neutrófilos, por meio do ligante PSGL-1 expresso na superfície destes leucócitos. O PSGL-1 está envolvido diretamente com o rolamento dos leucócitos sobre a superfície da célula endotelial. Além desta função de adesão celular, a P-selectina ligada ao PSGL-1 induz a geração de mensageiros intracelulares em leucócitos e o acionamento de uma série de mecanismos no citoplasma dos leucócitos que podem ser entendidos como um processo de ativação destas células. Portanto, as demais etapas da migração leucocitária e a resposta inflamatória como um todo estão intimamente relacionadas ao papel da P-selectina no fenômeno de recrutamento leucocitário (ANDRE, 2004).

A diversidade de papéis desempenhados pelas plaquetas tem suscitado novas abordagens e proposto novos paradigmas no estudo da inflamação e também no estudo da

resposta imune adaptativa. Nos processos patológicos de injúria ao endotélio e ao tecido subjacente, a plaqueta é o primeiro elemento da circulação a entrar em contato com a injúria celular e eventualmente tecidual. Naturalmente, o papel de linha de frente desempenhado pelas plaquetas evidencia sua importância nas etapas iniciais do processo inflamatório, mas a sua ação no local da injúria pode perdurar por mais tempo do que se acreditava até recentemente, influenciando não somente nos processos de neovascularização e de cicatrização, mas também a resposta adaptativa, e mais duradoura, do sistema imune (HILF et al., 2002; ELZEY et al., 2003).

Uma série de trabalhos recentes tem mostrado que o contato entre a plaqueta com agentes bacterianos, pertencentes a espécies diversas, é capaz de acionar mecanismos plaquetários de ativação, agregação e degranulação (YOUSSEFIAN et al., 2002; BYRNE et al., 2003; KALVEGREN et al., 2003; PAMPOLINA; MCNICOL, 2005). YOUSSEFIAN et al. (2002) mostraram que as plaquetas foram hábeis em internalizar tanto o vírus HIV quanto a bactéria *Staphylococcus aureus*, sendo esta habilidade plaquetária aumentada sob condições de ativação.

Adicionalmente, outras investigações sugeriram que as plaquetas desempenhariam um papel crucial na proteção contra a infestação por helmintos (JOSEPH et al., 1983; BOUT et al., 1986; PANCRE et al., 1990), enquanto outros autores evidenciaram a presença de receptores *toll-like* em plaquetas humanas (COGNASSE et al., 2005; ASLAM et al., 2006). Ainda, a produção e liberação pelas plaquetas de interleucina 1-beta (IL-1 β), um importante mediador inflamatório, também têm sido demonstradas (KAPLANSKI et al., 1993; LOPPNOW et al., 1998), e LINDEMANN et al. (2001) sugeriram a estas células um papel regulatório na inflamação aguda, baseado nos achados *in vitro* de que plaquetas ativadas, dentro de uma malha de fibrina, podem continuar produzindo IL-1 β por períodos prolongados de tempo.

Com relação à resposta imune adaptativa, investigações recentes têm proposto para as plaquetas uma importante função na apresentação de antígenos, no aumento da resposta da célula T CD8 e, conseqüentemente, na regulação da produção de anticorpos (HILF et al., 2002; ELZEY et al., 2003; KANEIDER et al., 2003). A já reconhecida capacidade da plaqueta em expressar a proteína CD154 (também conhecida como CD40L) pode ser um importante elo de ligação entre a coagulação, a inflamação e o sistema imune adaptativo. A

expressão da CD154 estimula a célula endotelial a iniciar a resposta inflamatória na parede do vaso, aumentando a expressão de moléculas de adesão na sua superfície e a liberação de mediadores inflamatórios (HENN et al., 1998). Além desta função na resposta inflamatória aguda, BENNETT et al. (2005) propuseram que a CD40L desempenharia um papel crítico na resposta imune adaptativa, conferindo à plaqueta que a expressa uma importante função, a de influenciar positivamente a resposta das células T e B, favorecendo assim a maturação das células dendríticas e o aumento da produção de IgG dependente da célula T. Por fim, o autor propõe que plaqueta tem um papel no atual paradigma da resposta do centro germinativo de célula B.

As plaquetas são responsáveis por uma importante interface entre os fenômenos relacionados à inflamação e à coagulação. Dentro da classe dos mamíferos, as plaquetas são as células sanguíneas que possuem um repertório molecular apto a desempenhar funções distintas, mas intrinsecamente relacionáveis, nos eventos ligados à hemostasia, defesa e reparo, (WEYRICH et al., 2003). Entretanto, certas condições fisiopatológicas podem levar a plaqueta a desempenhar papéis indesejados. Assim, a intrincada funcionalidade plaquetária permite que estas células desempenhem um papel chave na patogênese de graves doenças circulatórias.

Desta forma, a P-selectina e a sinalização promovida pelo complexo CD154/CD154L das plaquetas contribuem significativamente no aumento da resposta inflamatória de rolamento e de aderência leucocitária nos processos de isquemia cerebral seguidos de reperfusão (RUGGERI, 2002; ISHIKAWA et al., 2005). Ainda, estas células ocupam um papel central nos processos de aterogênese e, por conseguinte, na formação da placa aterosclerótica. Em um modelo murino, a P-selectina de plaquetas e de células endoteliais tem sido mostrada como um importante fator no grau de maturação da lesão ateromatosa, que pôde ser avaliada pela presença de células musculares lisas e pelo grau de calcificação da lesão (BURGER; WAGNER, 2003). Em contrapartida, a depleção plaquetária ou a inibição da adesão minimizaram a formação precoce da placa aterosclerótica em camundongos (MASSBERG et al., 2002), enquanto que infusões repetidas por muitas semanas de plaquetas ativadas em camundongos favoreceram a formação da lesão aterosclerótica (HUO et al., 2003).

Por outro lado, a plaqueta desempenha naturalmente um papel central na hemostasia, atuando no controle dos eventos hemorrágicos. A sua função em limitar o foco hemorrágico é classicamente estudada e conhecida, como destacado anteriormente, mas estudos têm proposto, como descrito acima, que o papel protetor da plaqueta ultrapassa a sua função de aderir em células/substrato, ativar-se e agregar. Outras vias pelas quais as plaquetas exerceriam um papel protetor foram apontadas há décadas por autores que mostraram que a plaqueta possui uma plasticidade incomum, podendo se projetar ela própria entre as junções interendoteliais, de forma isolada, ou até mesmo ser incorporada pelo citoplasma da célula endotelial, no intuito de melhor delimitar o leito vascular (WOJCIK et al., 1969).

Em outro estudo investigando o seu papel protetor, KENT et al. (1995) mostraram que a capacidade da plaqueta de estimular a regeneração endotelial de uma artéria lesada estaria diretamente relacionada à sua capacidade de se ligar direta entre plaqueta e célula endotelial, uma vez que o sobrenadante plaquetário não foi capaz de produzir o mesmo efeito regenerativo.

A ação do veneno loxoscélico sobre as plaquetas tem sido investigada ao longo das últimas décadas, tanto em modelos experimentais quanto em estudos *in vitro*. Uma das conseqüências da ação local deste veneno é a ativação plaquetária *in loco*, sendo o envolvimento destas células mostrado em trabalhos experimentais que evidenciam a diminuição do número de plaquetas circulantes em animais injetados com altas doses deste veneno (DENNY et al., 1964; BERGER et al., 1973; DA SILVA et al., 2003). Estudos realizados *in vitro* com veneno loxoscélico de diferentes espécies têm mostrado sua capacidade em promover a agregação plaquetária, bem como a participação da esfingomielinase D na indução deste processo (KURPIEWSKI et al., 1981; BABCOCK et al., 1986; REES et al., 1988; DA SILVEIRA et al., 2006).

Em recente trabalho experimental, TAVARES et al. (2004) investigaram as principais alterações hematológicas resultantes da ação do veneno de *L. gaucho* em coelhos, que tem sido ao longo dos anos o modelo experimental mais utilizado para o estudo da lesão dermonecrótica. Concomitante ao precoce e intenso quadro de trombocitopenia instaurado, observou-se que a contagem do número de leucócitos e, em especial, de neutrófilos, acompanhou a queda do número de plaquetas ao longo dos tempos

estudados. Histologicamente verificou-se a ocorrência de regiões com intenso infiltrado inflamatório e a expressiva formação de trombos intravasculares. O decréscimo sangüíneo destas duas linhagens celulares acompanhou a progressão da lesão, evidenciando a participação, de forma ativa ou passiva, dos leucócitos e das plaquetas no desenvolvimento da dermonecrose induzida pelo veneno loxoscélico.

*

*

*

A plaqueta, por ser um elemento figurado sangüíneo, está presente em toda a economia corpórea e participa de uma infinidade de fenômenos fisiológicos e patológicos, atuando por diferentes vias nas respostas reparadoras e mantenedoras da homeostasia. É ainda um importante elo entre a inflamação, a coagulação e a imunidade adaptativa, promovendo um ténue balanço entre os elementos celulares e moleculares que participam destes sistemas. Dependendo do processo fisiológico e/ou patológico que se considera, a plaqueta pode assumir diferentes papéis, favorecendo ora os fenômenos hemostáticos, ora os fenômenos inflamatórios, ora a modulação destas respostas.

Sabe-se que a exposição *in vitro* de plaquetas humanas a venenos loxoscélicos de diferentes espécies é capaz de promover a agregação plaquetária. Entretanto, a influência do veneno sobre outros importantes fenômenos plaquetários, como a adesão e a ativação, ainda não foram investigados. Além disso, a literatura científica não registra estudos *in vitro* a respeito da ação do veneno loxoscélico sobre plaquetas de coelhos, que tem sido ao longo de décadas o principal modelo experimental para o estudo da lesão dermonecrótica.

Com relação ao loxoscelismo e considerando-se a evolução da dermonecrose, muito pouco se sabe a respeito do papel que a plaqueta desempenha na patogênese dos fenômenos inflamatórios que disparam o início da dermonecrose. Da mesma forma, é também desconhecida a atuação da plaqueta (e ainda se esta atuaria de forma ativa ou passiva) ao longo da progressão da lesão. Ainda, desconhece-se qual a influência da série trombocítica sobre os demais eventos observados *in loco*, como a hemorragia local e a coagulação intra e extra-vascular. Assim, é possível que a plaqueta tenha uma participação efetiva ao longo do processo de formação da dermonecrose, favorecendo ou inibindo a instalação e a evolução de processos importantes para a lesão, como a hemorragia e a coagulação intravascular locais.

2 OBJETIVOS

- Caracterizar em plaquetas humanas e de coelhos o efeito *in vitro* do veneno total de *Loxosceles gaucho*, e de sua fração esfingomielinásica, sobre as funções de agregação, adesão e ativação plaquetárias.

- Avaliar o envolvimento das plaquetas na evolução da lesão dermonecrótica induzida pelo veneno total da aranha marrom, *Loxosceles gaucho*, utilizando para tanto um modelo de trombocitopenia experimental em coelhos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos deste trabalho que envolveram a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (processo 129/2003).

Duas cabras foram mantidas na fazenda São Joaquim, pertencente ao Instituto Butantan e localizada no município de Araçariguama, para a produção dos anticorpos anti-plaqueta de coelho. Os dois exemplares caprinos foram mantidos em condições de semi-confinamento, sendo alimentados com pastagem e suplementados com ração apropriada e com a supervisão veterinária adequada, sob condições sanitárias e de manejo indicadas para a espécie.

Para a obtenção das plaquetas usadas na imunização e para a execução da parte experimental proposta neste estudo, foram utilizados coelhos albinos da raça Nova Zelândia, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Visando-se uma maior homogeneidade dos grupos, utilizou-se somente animais machos, adultos, com pesos próximos a 3 kg. Estes foram mantidos sob condições de laboratórios, em gaiolas individuais, com água e ração sendo fornecidos *ad libitum*.

3.2 OBTENÇÃO DO VENENO

Foram utilizadas amostras retiradas de um “pool” de veneno de *Loxosceles gaucho*, que foi obtido a partir de um lote de 1.000 aranhas capturadas na região da grande São Paulo.

O veneno foi extraído e processado segundo a técnica de (BUCHERL, 1969) e modificado por Barbaro et al. (1992). Após a captura, as aranhas foram deixadas em repouso pelo período mínimo de uma semana antes da coleta do veneno. Para a extração, foram imobilizadas com pinças e submetidas a um estímulo de 30 volts, por 2 segundos, na região ventral do cefalotórax, a fim de induzir a secreção do veneno. Este foi imediatamente aspirado dos ferrões com o auxílio de uma micropipeta automática e depositado em tubo eppendorff contendo solução de NaCl 154 mM. Quando puro, o veneno é um líquido incolor e transparente. Uma contaminação ocasional, pelo conteúdo estomacal, torna o veneno turvo, sendo neste caso desprezado. O veneno obtido foi estocado à -20° C até o momento do uso. A

concentração protéica do veneno foi determinada pelo método de (BRADFORD et al., 1976), utilizando-se uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA).

3.3 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ESFINGOMIELINÁSICA A PARTIR DO VENENO OBTIDO

O veneno foi fracionado por cromatografia de troca iônica, utilizando-se o sistema rápido de cromatografia líquida de proteína (FPLC - Pharmacia, Uppsala, Suécia). As amostras foram aplicadas em colunas Mono S HR 5/5 ou Mono Q HR 5/5 equilibradas com tampão. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas por um gradiente de NaCl que variou de 0 a 1 M. Determinou-se o perfil de eluição pela medida da absorbância a 280 nm. As frações obtidas foram então agrupadas e caracterizadas por SDS-PAGE, separando-se a fração de 35 kDa, correspondente à fração esfingomielinásica do veneno.

3.4. AÇÃO *IN VITRO* DO VENENO DE *LOXOSCELES GAUCHO* E DA SUA FRAÇÃO ESFINGOMIELINÁSICA SOBRE AS PLAQUETAS

3.4.1 Coleta sangüinea para obtenção das plaquetas

Para os estudos *in vitro* de agregação plaquetária, a coleta sangüinea em coelhos normais e saudáveis foi realizada na artéria central do pavilhão auricular, por meio de um escalpe de calibre 21G. Este era introduzido na artéria e a amostra de sangue recolhida passivamente, ou seja, sem ser realizada pressão negativa, a fim de diminuir o risco de ativação plaquetária. As primeiras gotas eram desprezadas e o restante do sangue coletado em frasco contendo os anti-coagulantes citrato de sódio (1,3 M, adicionado ao sangue na proporção de uma parte de citrato para nove de sangue), ou ACD (citrato de sódio 85 mM, ácido cítrico 71,4 mM e D(+) glicose 111 mM; adicionado ao sangue na proporção de uma parte de ACD para seis de sangue). Em doadores humanos saudáveis, a coleta foi realizada na veia braquial. Utilizou-se os mesmo anticoagulantes descritos para a obtenção da plaqueta de coelho.

3.4.2 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e da suspensão de plaquetas lavadas (SPL)

Logo após a obtenção das amostras sanguíneas, estas foram centrifugadas a 150 g por 20 min (temperatura ambiente), em centrífuga Incibras modelo Spin VI. O sobrenadante, correspondente ao PRP, foi retirado e o restante do sangue foi recentrifugado a 1700 g por 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Após a contagem plaquetária no PRP, este último foi diluído e deixado em tubos plásticos fechados e mantidos à temperatura de 37°C até o momento da realização dos testes de agregação plaquetária.

Para a obtenção da SPL, o sangue anti-coagulado com ACD foi coletado e submetido ao mesmo procedimento descrito acima, até a obtenção do PRP. A este adicionou-se 10 µL de prostaglandina E₁ (PGE₁, na concentração de 200 µg/mL em etanol)/ mL de PRP. Logo após a centrifugação do PRP, o *pellet* foi ressuspensado em solução de Tyrode modificada sem cálcio (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; NaH₂PO₄ 0,42; MgCl₂ 1 mM; EGTA 0,26 mM; albumina bovina 0,35% (p/v); D(+) glicose 5,6 mM; apirase 0,02% (p/v); pH = 6,2) e mantido a 37°C por 10 minutos; centrifugou-se então essa suspensão 1700 g, à temperatura ambiente, por 20 minutos. O sedimento plaquetário obtido foi então novamente ressuspensado na mesma solução e centrifugado novamente. Por fim, o sedimento de plaquetas foi ressuspensado em solução de Tyrode modificada com cálcio (solução de Tyrode descrita acima, sem EGTA e adicionada de CaCl₂ 2 mM), em volume adequado para permitir o ajuste do número de plaquetas em 300x10⁹/L. Esta suspensão foi mantida a 37°C, em tubos fechados, até o momento dos testes de agregação plaquetária.

3.4.3 Ensaio de agregação plaquetária

Os efeitos do veneno de *Loxosceles gaucho* e de sua fração esfingomielinásica sobre a agregação plaquetária de PRP e SPL, de humanos e de coelhos, foram verificados por meio de um sistema ótico. A contagem plaquetária foi acertada para 300 x10⁹/L e a agregação foi realizada em um agregômetro Chrono-log (model 560VS) pelo método de BORN (BORN, 1962), com velocidade de agitação a 1000 rpm e temperatura constante mantida em 37°C. Os PRPs e SPLs foram mantidos aquecidos a 37°C sob agitação constante durante 2 minutos, nas cubetas de agregação, previamente à adição do agonista, do veneno total ou de sua fração. O registro das curvas foi feito com o auxílio do programa Aggro/Link for Windows, versão 4.75

(Chrono-log, EUA). O registrador foi ajustado de maneira que o registro da linha de base do PRP ou SPL, sem adição de agonistas, fosse mantido na linha de 0% de transmitância, enquanto que a solução de Tyrode (para plaquetas lavadas) ou o PPP (para agregação em PRP) fosse mantido na linha de 100% de transmitância. Os resultados de cada curva de agregação foram expressos em termos de porcentagem de agregação, isto é, a amplitude de agregação após 5 e 10 minutos de adição do agonista, do veneno ou da fração.

O veneno total ou sua fração foram diluídos em salina, e 10 μL de veneno total (concentrações finais de 20 e 40 $\mu\text{l/mL}$ para plaquetas humanas e de coelhos, respectivamente) foram adicionadas a 400 μL de PRP ou de SPL. A intensidade de agregação plaquetária em PRP ou SPL incubados com o veneno total, com a fração ou com o colágeno (Chrono-log[®] USA) foi avaliada durante 10 minutos. As amostras controle foram incubada com 2 ou 4 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno (concentração final), para PRP humano e de coelho, respectivamente.

3.4.4 Liberação de lactato desidrogenase (LDH)

Após o final da incubação do PRP com o veneno total de *L. gaucho* (20 $\mu\text{g/ml}$ para PRP humano e 40 $\mu\text{g/mL}$ para PRP de coelho) nos testes de agregação, as amostras de PRP foram centrifugadas em 1900 *g* por 15 minutos. O sobrenadante das amostras foi utilizado para determinar a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) das plaquetas, que é indicador clássico de lise celular. O protocolo de BURTIS & ASHWOOD (1986) foi modificado de tal forma que a atividade de LDH pudesse ser lida em microplacas de 96 poços para leitor de ELISA. Sucintamente, nos poços de uma microplaca foram colocados 200 μL de uma solução contendo $\beta\text{-NADH}$ 170 μM (diluído em uma solução contendo piruvato 14 *mM*; tampão Tris-EDTA 5 *mM*), ao qual se adicionou 5 μL da amostra teste de plasma. Foi utilizada uma curva cinética em leitor de placa de ELISA, com leitura a cada minuto. O cálculo da atividade de LDH deu-se através da seguinte fórmula, que leva em consideração o volume do poço da placa (0,2 *mL*), o volume da amostra (0,005 *mL*) e o coeficiente de absorção micromolar do NADH a 339 *nm* ($6,3 \times 10^{-3}$):

$$U/L (\mu\text{mol/min/L}) = \frac{A\Delta / \text{min}}{6,3 \times 10^{-3}} \times \frac{0,205}{0,005}$$

onde $A\Delta/\text{min}$ é igual à diminuição da absorbância máxima/minuto.

3.4.5 Ensaio de adesão plaquetária

Para os testes de adesão plaquetária, utilizou-se o plasma rico em plaqueta (PRP) obtidos de humanos e de coelhos. Este ensaio foi realizado em microplacas, como descrito previamente (ERIKSSON; WHISS, 2005), contendo algumas adaptações para viabilizar o estudo com o veneno loxoscélico. As microplacas foram sensibilizadas por cada poço com 50 μL de uma solução contendo 40 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno, diluído em ácido acético 5 mM, pelo período de 2 horas, a 37°C. Imediatamente antes do uso, as microplacas foram lavadas duas vezes com PBS contendo MgCl_2 . O bloqueio dos poços foi feito com 2 mg/mL de soroalbumina bovina, incubando-se por uma hora a 37 °C. Após lavar com PBS modificado, 40 μL /poço de PRP (contagens ajustadas para $75 \times 10^9/\text{L}$ e $150 \times 10^9/\text{L}$, para as amostras humanas e de coelho, respectivamente) foram adicionados em placas pré-aquecidas a 37 °C, e logo em seguida 10 μL de uma solução de veneno ou fração, serialmente diluída em solução salina, foram adicionados. Após incubação pelo período de 1 hora a 37 °C, as placas foram lavadas novamente com PBS e cada poço foi rapidamente suplementado com 150 μL de tampão citrato, pH 5.4, contendo 0.1% de Triton X-100 (para causar lise instantânea das plaquetas), e também *p*-nitrofenil fosfato 5 mM como substrato para as fosfatases plaquetárias. Após a incubação a 37 °C por uma hora, a reação foi parada e a cor desenvolvida pela adição de 100 μL de 2 M NaOH.. O *p*-nitrofenol produzido pela reação foi medido com um leitor de microplaca a 405 nm contra um branco de PPP. O percentual de células aderentes foi calculado com base em curvas padrões obtidas com pontos conhecidos de contagem plaquetária.

3.4.6 Ativação plaquetária - Citometria de fluxo das plaquetas

A fim de determinar a expressão de marcadores de ativação na superfície plaquetária, amostras de PRP de coelho e humano foram incubados com o veneno ou com sua fração e usadas para estudos de citometria de fluxo, como descrito por SANTORO et al. (2004). A intensidade de marcação de anticorpos conjugados com isotiacianato de fluoresceína (FITC) ou com ficoeritrina (PE) foram avaliados em PRP expostos ao veneno de *L. gaucho* e sua fração e comparado com um PRP, contendo plaquetas quiescentes (controle negativo), e ainda com um segundo PRP, contendo plaquetas ativadas pelo colágeno (controle positivo). Visando avaliar a intensidade da ativação plaquetária, foram utilizados os seguintes anticorpos:

- Anti-LIBS1 (gentil doação de Dr. Mark H. Ginsberg, Scripps Research Institute, La Jolla, EUA), um anticorpo monoclonal que reconhece um epítipo (LIBS1) sobre a GPIIb-IIIa, que é exposto pela mudança conformacional da GPIIb-IIIa, no momento em que esta interage com seu ligante, seja o fibrinogênio ou peptídeos que contenham a seqüência RGD, ou ainda a seqüência HHLGGAKQAGDV (GINSBERG et al., 1990). Este anti-LIBS1 ainda reage cruzadamente com a GPIIIa de coelho (RAND et al., 1999);
- 12A7 (gentil doação do Dr. Guy Reed, Havard School of Public Health, Boston, EUA), anticorpo monoclonal que reage especificamente com P-selectina de coelhos e usado para acessar a ativação plaquetária *in vitro* (REED et al., 1998);
- Anti-CD62P humana conjugada com PE (Pharminggen), monocloanal que reage especificamente com a P-selectina humana.
- IgY anti-GPIIb-IIIa de coelho conjugada ao FITC (Santoro et al., 2004), que mostrou-se eficaz em marcar a GPIIb-IIIa de coelho e também reconhece esta proteína em plaquetas humanas (SANTORO et al., 2004).

As plaquetas foram expostas, sob condições de agregômetro, ao veneno ou à sua fração por 10 minutos, ou ao colágeno por 5 minutos. Plaquetas quiescentes permaneceram sob agitação a 1000 rpm por 5 minutos a 37 °C. Logo em seguida, cada amostra foi fixada com um igual volume de paraformaldeído 2% em PBS (pH 7,4). Aliquotas de 25 µL de plaquetas fixadas foram incubadas com (1) 25 µL de uma solução de 40 µg/mL de anti-LIBS ou (2) 25 µL do anticorpo 12A7 por 1 hora à temperatura ambiente, sendo então adicionado 2 µL de conjugado de anti-IgG de camundongo produzido em cabra (Sigma); ou (3) 2 µL de anti-CD62P de humano conjugado à PE (100 µg/mL) ou (4) 2 µL de IgY anti-GPIIb-IIIa de coelho conjugado ao FITC (500 µg/mL) foram usados para amostras de plaquetas fixadas e incubadas por 1 hora (exceto para a última, 2 h) em temperatura ambiente e no escuro. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickson, EUA). Os dados de luz de dispersão e fluorescência de 10.000 eventos foram coletados com todos os detectores em modo logarítmico. Os dados foram salvos em arquivos em modo de lista do citômetro de fluxo para subsequente análise no programa WinMDI, versão 2.8.

3.5 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.5.1 Obtenção do anticorpo anti-plaqueta de coelho

3.5.1.1 Coleta sangüínea para obtenção e processamento de plaquetas de coelho

As plaquetas de coelho para imunização das cabras foram obtidas de quatro animais machos adultos anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg). O sangue foi coletado por punção da artéria carótida, exposta por procedimento cirúrgico, para a obtenção do maior volume possível de sangue. A coleta sangüínea foi realizada em seringas plásticas que continham previamente o anticoagulante ACD modificado (citrato de sódio 75 mM; ácido cítrico 42 mM; D(+) glicose 139 mM; teofilina 15 mM; adenosina 3,7 mM), na proporção de uma parte de anticoagulante para 6 partes de sangue. O procedimento de lavagem foi idêntico ao realizado para a obtenção da SPL (item 3.4.2.). Finalmente, após a última centrifugação, as plaquetas foram dissolvidas em tampão de lise (Tris 10mM; NaCl 150 mM; CaCl₂ 1 mM; NaN₂ 0,05%; Triton X-100 1%; PMSF 2 mM; pH 7,4) e homogeneizadas vigorosamente, para que ocorresse a ruptura plaquetária. Após o repouso a 4° C por 10 minutos, esta suspensão foi centrifugada a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado do precipitado e armazenado sob congelamento de -70°C até o momento do uso. Uma alíquota foi separada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1974).

3.5.1.2 Imunização das cabras

A suspensão de tampão de imunização contendo plaquetas lisadas foi descongelada no dia da administração do antígeno nas duas cabras. Para sua preparação, em quantidade suficiente para imunizar uma cabra, 2 mL da suspensão do antígeno foi sendo acrescentada lentamente a 2 mL de Montanide ISA 50V® (Seppic, EUA) em um becker sendo agitado por um emulsificador. Por último acrescentou-se 4 mL de uma solução de NaCl 154 mM + Tween 80 (Sigma-Aldrich) a 2% (v/v). O becker foi agitado até se atingir um ponto de emulsificação em que a suspensão não apresentasse dissolução em água. Para a primeira imunização, foi acrescentada 1% de BCG (p/v). Para os reforços de imunização seguintes ("boosters"), o BCG não foi acrescentado.

Para o procedimento de imunização, parte do dorso das cabras foi raspado e 8 mL da suspensão para imunização foram aplicados por cabra, divididos em 1 mL por ponto, num

total de oito pontos. Após 15 dias, foi realizado o primeiro booster, sendo os dois outros feitos em intervalos mensais.

Uma amostra de sangue de 5 mL era coletada antes das imunizações para obtenção de soro e posterior titulação dos anticorpos produzidos. O título da amostra coletada no dia da primeira imunização foi considerado como o título inicial (T zero), e as demais coletas para verificação dos títulos foram realizadas no dia dos reforços, anterior ao procedimento de imunização. Por último, foram tituladas as amostras de soro obtidas da sangria dos dois animais, realizada 10 dias após a terceira e última imunização.

Para as coletas de grande volume, cerca de 150 mL de sangue foram obtidos da veia jugular, por coleta estéril à vácuo em frascos de 8 mL (Vacutainer®) contendo gel para a coagulação do sangue e posterior separação do soro. Após o período aproximado de uma hora em banho maria, visando a retração sangüínea máxima, os tubos foram centrifugados a 3.000 g para a melhor separação do soro. Este foi congelado e mantido a -70°C até o momento da purificação da IgG.

3.5.1.3 Purificação de anticorpos IgG do soro de cabras

Os anticorpos foram purificados do soro de cabras, utilizando-se o protocolo descrito por McKinney & Parkinson (1987). O processamento do soro das duas cabras foi realizado separadamente. Sucintamente, 50 mL de soro caprino foram adicionados a 200 mL de tampão acetato 60 mM (pH 4,0) e o pH acertado para 4,5 com HCl 1 M. Adicionou-se 6,3 mL de ácido caprílico, gota a gota, para a separação dos anticorpos de outras proteínas séricas. Após a centrifugação a 10.000 g durante 30 minutos, ao sobrenadante foi adicionado 0,277 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido para cada mL da solução, com o intuito de precipitar a IgG. Centrifugou-se novamente esta solução e o precipitado de IgG obtido foi dissolvido em salina tamponada (PBS) (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; pH 7,4) contendo Na_2EDTA 2 mM. Em seguida, dialisou-se essa solução de IgG de cabra contra 2,0 L do mesmo tampão, duas vezes concentrado. A concentração protéica da solução de IgG em PBS foi obtida pelo método do ácido bicinonínico (Smith et al., 1985). Após a diálise, essa solução de IgG foi alíquotada, congelada e mantida a -70°C até o momento do uso.

3.5.1.4 Determinação dos títulos de anticorpos anti-plaqueta por ELISA

Para a titulação dos anticorpos IgG, placas de ELISA Poli-sorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 μ L da solução de plaquetas de coelho utilizada como antígeno para a produção dos anticorpos, diluído em tampão carbonato pH 9,6 a uma concentração de 10 μ g/mL. As placas foram incubadas a 4° C em câmara úmida por 18 h e a seguir lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,05%). Logo após, aos poços se adicionaram 200 μ L de solução bloqueadora (albumina bovina 3% em tampão carbonato, pH 9,6) por 2h a 37° C, e logo a seguir foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Em seguida, os poços foram incubados com 100 μ L de diluições seriadas na razão de 2, partindo de uma diluição inicial de 50 vezes (1/50) da solução da IgG purificada. O anticorpo foi diluído em tampão de incubação (PBS; albumina bovina 1%; Tween 20 0,05%; pH 7,4). Após 1 h de incubação a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Logo depois, foram adicionados aos poços 100 μ L do conjugado de IgG-peroxidase anti-IgG de cabra (Sigma-Aldric), diluído 1/40.000 em tampão de incubação, permanecendo por 1 h a 37°C, em câmara úmida. As placas foram novamente lavadas 3 vezes. Para a revelação, adicionou-se aos poços 100 μ L de uma solução recém-preparada de substrato (orto-fenileno-diamina (OPD) 1 mg/mL e H₂O₂ 0,03%, dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 30% (50 μ L/poço). A absorbância dos poços das placas foi lida em um leitor de ELISA Multiskan EX, com comprimento de onda ajustado para leitura em 492 nm.

Definiu-se como título a menor concentração de anticorpo capaz de desenvolver uma leitura igual ou superior a 0,100 ao se subtraírem as absorbâncias das diluições seriadas dos poços, sensibilizados com antígeno, pelos seus respectivos brancos (poços não sensibilizados com o antígeno).

3.5.1.5 Teste para a presença de pirogênio na IgG purificada

Considerando-se que alguns dos coelhos utilizados nos experimentos preliminares para verificação da eficácia da IgG na indução da trombocitopenia apresentaram sintomas febris (tremores leves, rubor e aumento da temperatura nas orelhas), foram então feitos testes para

verificar a presença de pirogênio nas amostras de IgG purificadas. Para tanto, três coelhos machos adultos da raça nova zelândia foram injetados i.v. com 10 mL de uma solução de NaCl 154 mM estéril contendo a IgG na dose de 10 mg de proteína por kg de peso vivo, processada como descrita anteriormente. Para o teste, a temperatura retal basal foi tomada previamente, meia hora antes da administração da amostra, por eletrodos conectando os animais a um registrador automatizado de temperatura, prosseguindo os registros a cada intervalo de trinta minutos, pelo período de três horas. Finalizado o teste do pirogênio, amostras sanguíneas foram coletadas da veia auricular para contagem plaquetária, visando avaliar a eficácia da dose utilizada da IgG na indução do quadro trombocitopênico.

3.5.1.6 Padronização da quantidade de IgG a ser administrada para indução e manutenção da trombocitopenia - Número de leucócitos, de polimorfonucleares e de mononucleares nos animais trombocitopênicos

Com base no grau moderado de trombocitopenia obtida pela administração da IgG purificada no teste do pirogênio, foi testada então uma dose maior da IgG anti-plaqueta. Os coelhos foram infundidos i.v. com a IgG anti-plaqueta, diluída na concentração de 5 mg/mL, em solução de NaCl 154 mM estéril, por meio de um escalpe de calibre 25G. Para a administração do anticorpo foi utilizada a veia marginal do pavilhão auricular esquerdo. A infusão lenta do volume correspondente à dose de 30 mg/kg não causou reações adversas nos animais. A obtenção de pequenas amostras de sangue para contagem de plaquetas e leucócitos, por sua vez, foi obtida da orelha direita, por punção realizada por meio de um escalpe de calibre 21G. As primeiras gotas eram desprezadas e o restante do sangue era coletado em frasco com anticoagulante (EDTA sódico 2,7 mM). A contagem plaquetária foi acompanhada ao longo dos tempos de zero (anterior à administração do anticorpo), 1, 3, 6, 24 e 72 horas após a administração do anticorpo anti-plaqueta. Ainda, com o intuito de acompanhar a resposta da série branca frente à administração do anticorpo, foi contado nestas mesmas amostras de sangue o número de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de monócitos, por contagem manual em câmara de Neubauer, para melhor diferenciação das células.

3.6 Delineamento Experimental

3.6.1 Injeção i.d. do veneno de *L. gaucho* em coelhos trombocitopênicos e em coelhos com contagem normal de plaqueta.

Com o objetivo de avaliar o papel da plaqueta no desenvolvimento da dermonecrose induzida pelo veneno loxoscélico, realizou-se o estudo comparativo dos efeitos do veneno em animais trombocitopênicos e em animais normais (coelhos com contagem normal de plaquetas). Ainda, com a finalidade de estudar a resposta sistêmica frente aos diferentes tratamentos, foram avaliados parâmetros hematológicos e a funcionalidade dos polimorfonucleares. Assim, foram utilizados os seguintes grupos de experimentais:

- ❖ Trombocitopênico experimental: infundido i.v. com a IgG anti-plaqueta e injetado i.d. com veneno loxoscélico;
- ❖ Normal (número normal de plaquetas) experimental: infundido i.v. com salina estéril e injetado i.d. com veneno loxoscélico;
- ❖ Trombocitopênico controle: infundido i.v. com IgG anti-plaqueta e injetado i.d. com salina.
- ❖ Normal controle: infundido i.v. com salina e injetado i.d. com salina.

Para cada um destes grupos, foram avaliados os tempos de 4, 24 e 120 horas, sendo utilizado um n de 5 animais para cada tempo. Transcorrido estes tempos após a injeção i.d. do veneno, procedeu-se à coleta sangüínea para obtenção de plasma (anticoagulado com citrato de sódio 130 mM) e de sangue (anticoagulado com EDTA sódico 2,7 mM), realizadas a partir da artéria central do pavilhão auricular. Coletas sangüíneas prévias foram feitas três dias antes do início dos experimentos, como controle dos parâmetros hematológicos e plasmáticos. Para a indução da trombocitopenia nos animais, procedeu-se como descrito no item 3.5.1.6.

O protocolo experimental para os coelhos injetados i.d. com o veneno de *L. gaucho* (5 µg de veneno total diluído em volume de 200 µL de solução estéril de NaCl 154mM) foi executado conforme o esquema da figura 2.

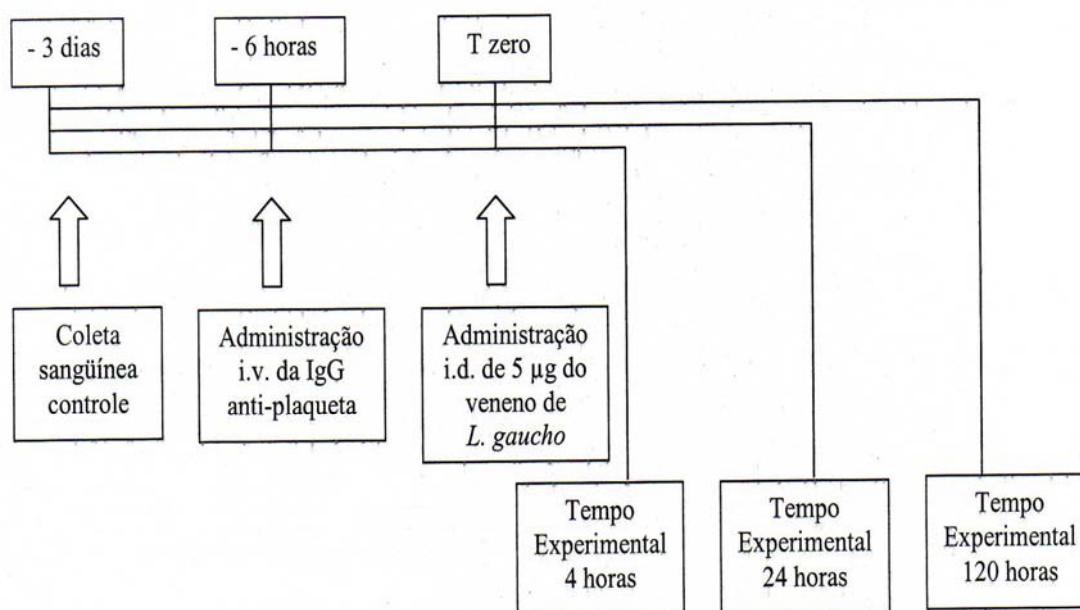


Figura 2 - Diagrama esquemático do protocolo experimental para os animais trombocitopênicos.

3.6.2 Análise da área da lesão

Logo após os procedimentos de coleta, os coelhos foram devidamente anestesiados com tiopental sódico (30 mg/kg) e sacrificados com uma solução de KCl 5 M. Após o sacrifício, foram medidas as áreas da lesão, sendo tomadas as áreas superficiais correspondentes aos eventos visualizáveis: edema, eritema, equimose e escara necrótica. As áreas foram medidas e analisadas pelo programa KS300 (Zeiss). Por fim, as amostras da lesão (grupos trombocitopênico e normal injetados i.d. com veneno) e amostras da pele normal (grupos normal e trombocitopênico controles injetados i.d. com salina) foram coletadas para processamento e análise histopatológica.

3.6.3 Fagocitose via C3b por polimormofonucleares de coelho

Com a finalidade de investigar a funcionalidade dos neutrófilos circulantes, estudou-se a fagocitose via C3b para avaliar a capacidade da célula polimorfonuclear de fagocitar partículas opsonizadas pelo fragmento C3b do complemento, metodologia esta utilizada como indicador do estado da capacidade fagocítica da célula frente ao estímulo do seu receptor de C3b (CURI et al., 1998).

A metodologia para separação dos polimorfonucleares de coelhos foi adaptada dos trabalhos de Boyum (1968) e de Kouoh et al. (2000). Um volume de 5 mL de sangue periférico heparinizado (15 U/mL) foi adicionado a uma solução de Dextran a 3% diluído em PBS e submetido a sedimentação por aproximadamente 20 minutos. Um volume de 5 mL desse sobrenadante foi colocado sobre 5 mL de histopaque (densidade de 1.077) em um tubo falcon de 15 mL. Após centrifugação à 400 g por 30 minutos à temperatura ambiente, a camada de polimorfonucleares foi coletada e submetida à hemólise hipotônica pela adição de água destilada; a osmolaridade normal foi refeita pela adição de PBS duas vezes concentrado, sendo por fim centrifugada a 400 g por 10 minutos. O pellet foi ressuspense em 1 mL de PBS e realizada a contagem de células polimorfonucleares em câmara de Neubauer para ajustar a concentração de células para 4×10^5 /mL.

Para a opsonização, foi utilizada uma suspensão de partículas de zymosan contendo 1×10^6 /mL em 300 μ L de PBS, adicionada de 300 μ L de soro de coelho normal e incubada a 37° C. Após centrifugação por 10 minutos a 3000 RPM, o pellet das partículas foi ressuspense em meio RPMI. Logo após, 0,5 mL da suspensão de polimorfonucleares, contendo 2×10^5 destas células, foi adicionada de 0,5 mL de meio RPMI com zymosan opsonizado. Duplicatas destas amostras foram incubadas por 40 minutos a 37° C em um recipiente de plástico contendo CO₂ (pastilhas efervescentes de antiácido foram colocadas em copos com água para liberação do gás). Após a incubação, os esfregaços foram confeccionados utilizando uma centrífuga citológica (Fanem, mod 248), na rotação de 600 RPM durante 100 segundos. As lâminas foram coradas pelo método de Rosenfeld e a contagem das células foi feita de acordo com um “score”, somando-se:

- N° de células que não fagocitou nenhuma partícula de zymosan X 0
 - N° de células que fagocitou 1 partícula de zymosan X 1
 - N° de células que fagocitou 2 partículas de zymosan X 2
 - N° de células que fagocitou 3 ou mais partículas de zymosan X 3
- +
- Resultado expresso em número absoluto

3.6.4 Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada

Visando avaliar os efeitos sobre a funcionalidade do sistema da coagulação nos animais submetidos a diferentes tratamentos, o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) foram mensurados nas amostras de plasma de coelhos pertencentes a todos os grupos experimentais. As amostras de plasma foram obtidas após centrifugação a 2000 g por 15 minutos (temperatura de 4° C) do sangue citratado. O plasma separado foi aliquoteado e congelado a -70°C até o momento do uso. A medida dos tempos em ambos os testes foi feita em um coagulômetro Quick Timer (Drake), utilizando-se o kit Diacelin® (Diamed) para a obtenção do TTPA, e o kit Diaplastin® (Diamed) para a obtenção do TP, de acordo com as instruções do fabricante.

3.6.5 Dosagem de vonWillebrand

Para a dosagem do fator de vonWillebrand em amostras plasmáticas, placas de ELISA Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100µL/poço de uma solução de IgG de cabra anti-vWF humano (21,1 µg/mL0 em tampão carbonato pH 9,6. O anticorpo específico para o vWF humano, que também reage como vWF de coelho, foi adquirido da DiaSorin (Minnesota, EUA). As placas foram incubadas a 4°C, em câmara úmida, por 18 h e a seguir lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (item 3.5.1.4).

Os poços foram bloqueados com 200 µL de solução bloqueadora (item 3.5.1.4) por 2 horas a 37°C, em câmara úmida. A seguir, as placas foram lavadas durante 5 min, por 3 vezes, com tampão de lavagem.

Para a obtenção da curva padrão de vWF de coelho, utilizou-se como referência uma combinação de plasmas citratados de seis coelhos, obtidos conforme descrito em 3.5.1.4. Esta solução do plasma referência foi diluída seriadamente na razão de 2, de 1/5 até 1/2560, em tampão de incubação. Todas as diluições do plasma de referência e as amostras de PPP (100

μL/poço) foram aplicadas em triplicata nas placas. Após 1 hora de incubação a 37°C em câmara úmida, as placas foram lavadas 3 vezes durante 5 min com um tampão de lavagem.

A seguir, aos poços foram adicionados 100 μL de IgG de cabra anti-vWF (DiaSorin), marcada com NHS-biotina, na concentração de 500 ng/mL, em tampão de incubação modificado (item 3.5.1.4.). O protocolo seguido para a conjugação da IgG anti-vWF foi semelhante ao descrito no item 3.5.1.4. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C em câmara úmida e a seguir lavadas 3 vezes durante 5 minutos com tampão de lavagem.

Adicionaram-se aos poços 100 μL de uma solução de conjugado avidina-peroxidase (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 ng/mL em tampão de incubação modificado (item x-x). As placas foram incubadas por 1 h a 37°C em câmara úmida e a seguir lavadas 3 vezes durante 5 min com tampão de lavagem.

A revelação da reação foi feita como descrito no item (3.5.1.4).

3.6.6 Coloração histológica de fibrina-plaqueta

Os fragmentos de pele para análise histopatológica foram fixados em solução tamponada de Bouin por 8 horas (ácido pícrico 0,2% e paraformaldeído 2% em PBS, pH 7,4), transferidas e mantidas em solução de etanol 70% até o momento da inclusão em parafina. Para a inclusão, os fragmentos passaram por uma bateria de desidratação de etanol 70%, etanol 95% (2 vezes, 1 hora cada), etanol absoluto (2 vezes, 1 hora cada), xilol (2 vezes, 1 hora cada) e parafina (2 vezes, 1 hora cada). Após essa bateria, os fragmentos foram incluídos em parafina e processou-se então os cortes histológicos.

Os cortes histológicos de 5 μm foram colocados em estufa a 60° C por 30 minutos e depois imersos em uma bateria para hidratação de 5 minutos cada (duas trocas em xilol, duas em etanol absoluto, duas em etanol 95%, duas em etanol 70%, e enxaguados em água de torneira e água destilada.

Para a visualização e diferenciação de redes de fibrina e plaquetas nos órgãos analisados, os cortes histológicos foram corados pelo método de Fraser-Lendrum (LUNA, 1968).

Após incubação em solução de Zenker (K₂Cr₂O₇ 2,5%; Na₂SO₄ 1%; HgCl₂ 5%; ácido acético glacial 5%) durante 2 horas à temperatura ambiente, os cortes foram enxaguados em água de torneira por 2 minutos e incubados em solução de iodo de lugol (iodo ressublimado 1%; KI 2%) por 15 minutos, enxaguados em água de torneira e incubados por 15 minutos em

solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5%). Logo depois, os cortes foram lavados em água destilada por 5 minutos e tratados com solução de sulfato férrico amoniacal 5% por 5 minutos. Após essa incubação, os cortes foram lavados em água de torneira e corados pela hematoxilina de Mayer por 5 minutos. Em seguida, foram lavados em água de torneira e corados em solução de picro-laranja G (0,2 g de laranja G dissolvidos em 20 mL de uma solução aquosa saturada de ácido pícrico acrescida de 80 mL de uma solução saturada de ácido pícrico em isopropanol) por 5 minutos. Os cortes foram posteriormente lavados em água corrente, imersos em uma solução de ponceau-fucsina (fucsina ácida 0,05% e ponceau 1%) por 5 minutos e lavados em água de torneira. Então os cortes foram corados novamente em solução de picro-laranja G por 15 segundos e lavados novamente. A diferenciação das cores foi feita por imersão dos cortes em solução de ácido fosfotúngstico 1% por 5 minutos; em seguida, os cortes foram lavados em água corrente e corados em solução de azul de anilina-acética (azul de anilina 1% em ácido acético 1%) por 2 minutos. Por fim, os cortes foram lavados em água de torneira, desidratados em bateria de etanol 70%, etanol 95%, etanol absoluto e xilol, (cinco minutos em cada um) e montados em Entellan (Merck).

Os resultados podem ser visualizados da seguinte forma: A fibrina se cora em vermelho vivo; as plaquetas em azul-violeta; as hemácias em amarelo-alaranjado; as fibras de colágeno em azul vivo; os leucócitos em roxo.

3.6.7 Imuno-histoquímica para marcação de GPIIb-IIIa

Com o intuito de localizar as plaquetas no diferentes tecidos, seja no local da lesão, seja no local de retirada destas células de circulação, foram feitas reações imuno-histoquímicas com anticorpo policlonal específico para a marcação da glicoproteína plaquetária GPIIb-IIIa, conforme descrito por Santoro et al. (2004).

Os cortes, obtidos e reidratados como descrito acima, foram imersos em solução de H_2O_2 metanólico (H_2O_2 0,6% em metanol 80%), por 20 min à temperatura ambiente, para a inibição da atividade endógena da peroxidase. Após enxaguar, os cortes foram incubados em solução de tripsina bovina (grau B, pâncreas bovina, Calbiochem, USA) (tripsina bovina 0,1%; CaCl_2 9 mM; NaCl 154 mM) por 20 min à temperatura ambiente. Logo depois, os cortes foram lavados em NaCl 154 mM e incubados com o anticorpo.

A revelação das plaquetas nos órgãos, os cortes foram então incubados com uma solução de IgY anti-GPIIb-IIIa de coelho 6,6 µg/mL em PBS-albumina (albumina bovina 1% e Tween 20 0,05% em PBS, pH 7,4) por 18h, em câmara úmida, a 4°C. Utilizou-se 0,5 mL desta solução por lâmina.

Após a incubação, os cortes foram enxaguados em PBS com Tween 20 (0,05%), com 3 trocas de 5 min cada. Em seguida, os cortes foram incubados com os respectivos conjugados. Os cortes foram enxaguados e então incubados o respectivo conjugado. Para a revelação da GPIIb-IIIa, estes foram incubados com IgG de coelho, conjugada com peroxidase, anti-IgY de galinha (Sigma-Aldrich), diluída 1/200 em PBS-albumina. A incubação dos cortes com os conjugados foi feita por 2 h, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Logo após, os cortes foram enxaguados em PBS com Tween 20 0,05%, com trocas de 5 min cada.

Para revelar a reação, os cortes foram incubados por 1 min à temperatura ambiente com uma solução de tetracloro de diaminobenzidina (DAB) (6 mg de DAB dissolvidos em 11 mL de tampão Tris 50 mM, pH 7,6, contendo CoCl₂ 1,15 mM e H₂O₂ 0,03%). A reação foi interrompida com a lavagem dos cortes em água de torneira. A contra-coloração foi feita imergindo-se os cortes em uma solução de vermelho neutro (Merck) 1% por 4 min. Finalmente, os cortes foram desidratados e montados em Entellan (Merck).

3. 7 Análise estatística

Os testes de ANOVA de duas entradas, seguido do teste de Tukey, foram usados para analisar os dados experimentais comparando os diferentes tratamentos, dentro dos diferentes tempos experimentais. Os dados dos experimentos *in vitro* foram feitos com ANOVA de uma entrada. Finalmente, para as amostras não pareadas utilizou-se o teste de t-student. As análises estatísticas foram feitas no programa STATATM, versão 5.0, e SigmaStat versão 2.03 (SSPS, Chicago, IL, EUA). Diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados dos ensaios *in vitro*

4.1.1 Agregação plaquetária em suspensão de plaqueta lavada (SPL)

Os dados de agregação plaquetária obtidos em SPL evidenciaram que as plaquetas humanas e de coelhos não agregaram, neste sistema, quando expostas ao veneno de *L. gaucho* ou ao seu principal componente, a fração esfingomielinásica. Entretanto, o registro do agregômetro indicou um leve decréscimo na transmissão de luz da SPL de ambas as espécies quando estas plaquetas foram incubadas com o veneno ou com sua fração (dados não mostrados). Assim, esse aumento de transmissão da luz indica uma mudança de forma nas plaquetas, que no entanto não foi capaz de culminar no fenômeno de agregação plaquetária.

4.1.2 Agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP)

O veneno total e sua fração esfingomielinásica induziram um aumento na transmissão de luz dos PRPs de ambas as espécies (Fig. 3). A intensidade desta resposta foi mais evidente no PRP humano, cuja agregação atingiu um valor médio de 65 ± 12 % (média \pm erro padrão da média) de transmitância, utilizando-se uma concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ de veneno total, e de 59 ± 8 % perante a exposição a uma concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ do componente esfingomielinásico. Já as plaquetas de coelho agregaram e atingiram valores de agregação de 56 ± 6 e de 21 ± 4 %, apresentando-se portanto menos sensível ao estímulo pelo veneno loxoscélico e sua fração, uma vez que necessitou de uma concentração duas vezes mais alta, tanto do veneno quanto da fração, para atingir um patamar semelhante de agregação plaquetária.

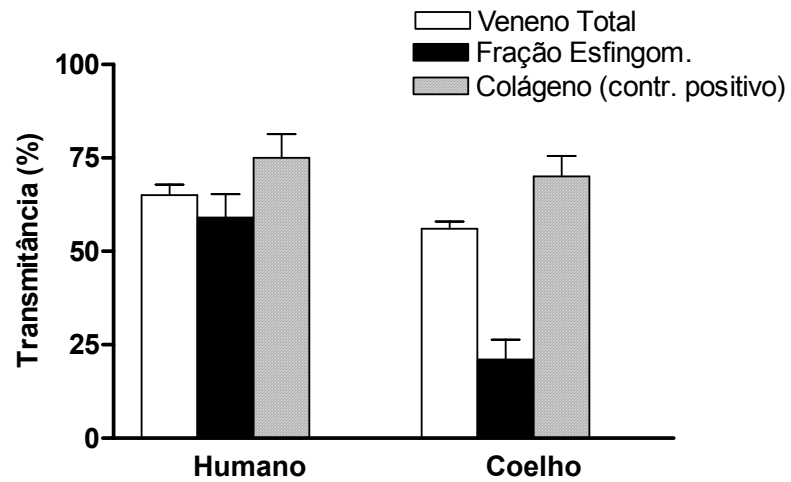


Figura 3 - Agregação plaquetária induzida pelo veneno de *Loxosceles gaucho* e de sua fração esfingomielinásica em PRP de coelho e de humano. O PRP humano foi incubado com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno (controle positivo), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno total e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fração. O PRP de coelho foi incubado com 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno (controle positivo), 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno total e 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fração. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n=5).

4.1.3 Atividade de LDH

O nível de lise plaquetária nos PRPs humano e de coelho (Fig.4), incubados com o veneno total de *Loxosceles gaucho*, foi avaliado pela dosagem da atividade da enzima LDH, cuja liberação pelas plaquetas é utilizado como indicativo de rompimento da membrana celular. Dosando-se o nível de LDH nas amostras de plasma pobre em plaqueta (PPP) obtidos após a centrifugação dos PRPs incubados com o veneno, sob as condições de agregômetro, não foram observadas diferenças nos níveis destas enzimas em relação aos níveis do PPPs não expostos ao veneno total.

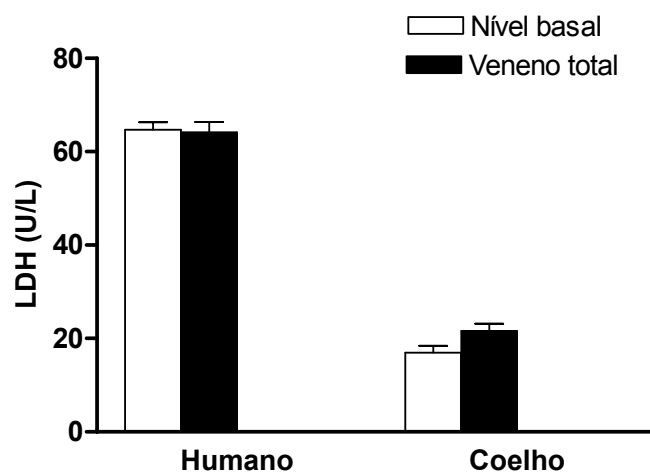


Figura 4 - Efeitos da incubação de PRP humano e de coelho com 20 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ de veneno total de *Loxosceles gaucho*, respectivamente, sobre a liberação de LDH. Níveis basais foram analisados no PPP de ambas as espécies. Dados expressos como média \pm e.p.m. (n=5).

4.1.4 Ativação plaquetária

As condições para o estudo da ativação plaquetária por citometria de fluxo foram as mesmas utilizadas para o estudo da agregação, sendo as concentrações do veneno total e da fração esfingomielinásica duas vezes maior para o PRP de coelho do que para o PRP humano. Os resultados obtidos, presentes na figura 5, indicaram um aumento estatisticamente significativo na expressão de LIBS1 das plaquetas de ambas as espécies, humanas e de coelhos, expostas ao veneno total de *L. gaucho*. Entretanto, esta resposta de aumento na exposição deste marcador não se reproduziu através da incubação das plaquetas com a fração esfingomielinásica.

Sob as condições experimentais e com as concentrações utilizadas para este trabalho, a fração esfingomielinásica também não mostrou-se capaz de induzir a elevação da expressão dos outros dois marcadores investigados, a P-selectina e a GPIIb-IIIa, tanto nas plaquetas humanas quanto nas plaquetas de coelhos.

Com relação ao veneno total, este foi capaz de induzir um aumento da expressão de P-selectina em plaquetas de coelhos. Entretanto, não induziu aumento significativo da expressão desta proteína em plaquetas humanas.

A expressão da GPIIb-IIIa não apresentou-se aumentada frente aos tratamentos com veneno total ou com a sua fração, nas plaquetas de nenhuma das espécies.

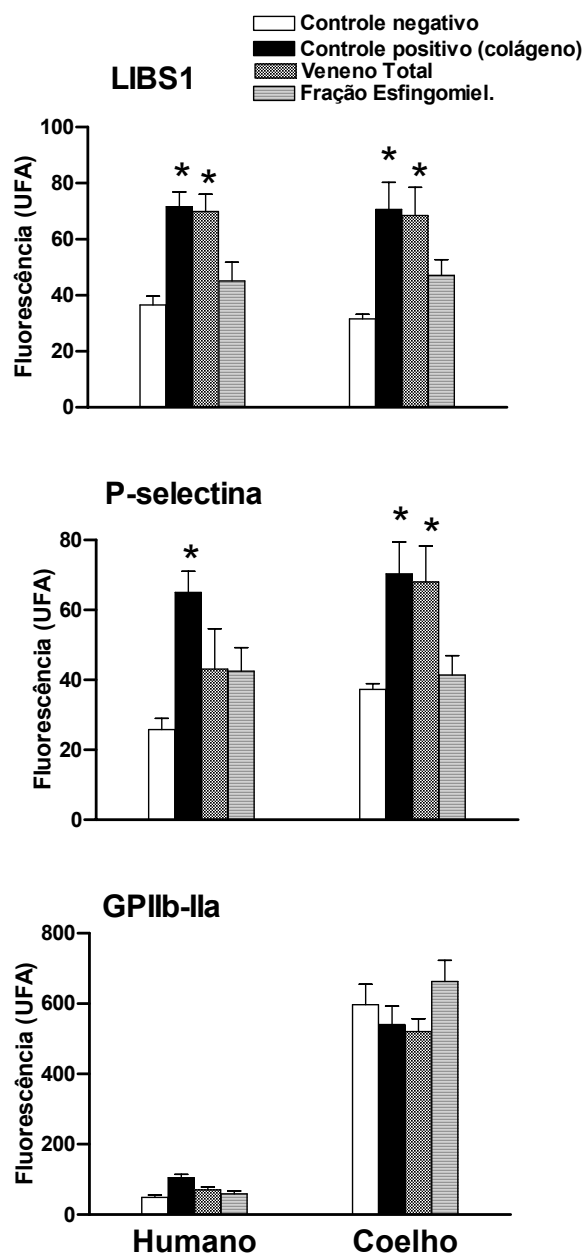


Figura 5 - Expressão de marcadores da ativação plaquetária, analisada por citometria de fluxo, em plaquetas de coelho e humana, incubadas com o veneno total de *L. gaucho* e sua fração esfingomielinásica. O PRP humano foi incubado com 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno (controle positivo), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno total e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fração. O PRP de coelho foi incubado com 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno (controle positivo), 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno total e 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fração. Plaquetas quiescentes foram usadas como controle negativo para ambas as espécies. Os dados estão expressos como a média geométrica \pm e.p.m (n=5). * $P < 0.05$ vs. controle negativo.

4.1.5 Adesão plaquetária

Os ensaios de adesão plaquetárias mostraram que ambas as plaquetas, de humano e de coelho, aderiram com alta afinidade às microplacas sensibilizadas com o colágeno, em um modo dependente da número de plaquetas no PRP (Fig. 6). Através da construção destas curvas de calibração, verificou-se que as contagens plaquetárias de $75 \times 10^9/L$ e de $150 \times 10^9/L$, respectivamente para os PRPs humano e de coelho, corresponderam ao número ótimo para os ensaios de adesão plaquetária, tanto para a presença do veneno total de *L. gaucho* quanto para a sua fração esfingomielinásica. Estas duas contagens plaquetárias possibilitaram a obtenção de resultados mais homogêneos para as curvas dose-resposta.

Na presença da fração esfingomielinásica, mas não na presença do veneno total de *L. gaucho*, a adesão de plaquetas de ambas as espécies foi dose-dependente (Fig. 7). O aumento percentual na adesão plaquetária em função da concentração de esfingomielinase foi mais intensa em PRP de coelhos do que em PRP humano. Apesar de uma resposta irregular causada pelo veneno total, a adesão verificada em PRP humano foi mais intensa do que aquela verificada em PRP de coelhos.

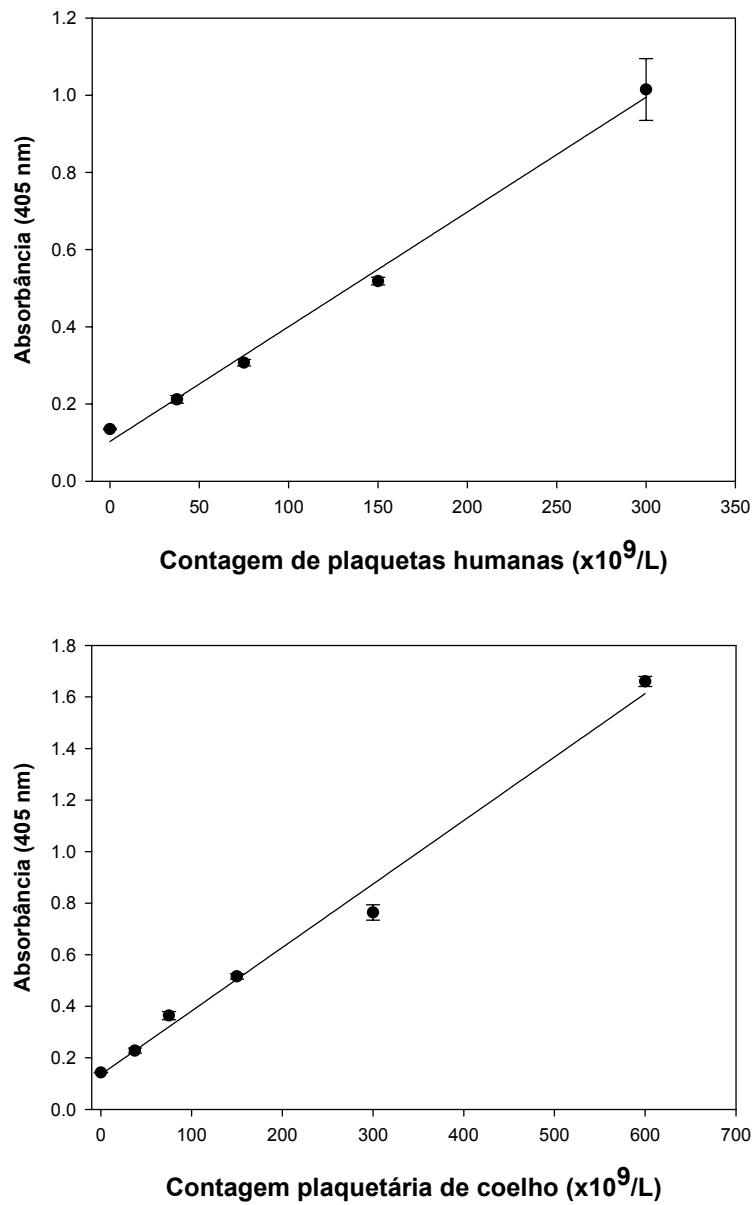


Figura 6 - Curva padrão para adesão plaquetária de PRP humano e de coelhos. Correlações lineares foram observadas para a mudança na absorbância em 405 nm versus a contagem plaquetária (humano: $r^2 = 0.994$; coelho: $r^2 = 0.989$; ambos com um $p < 0.0001$). Dados estão expressos como média \pm e.p.m, n=5).

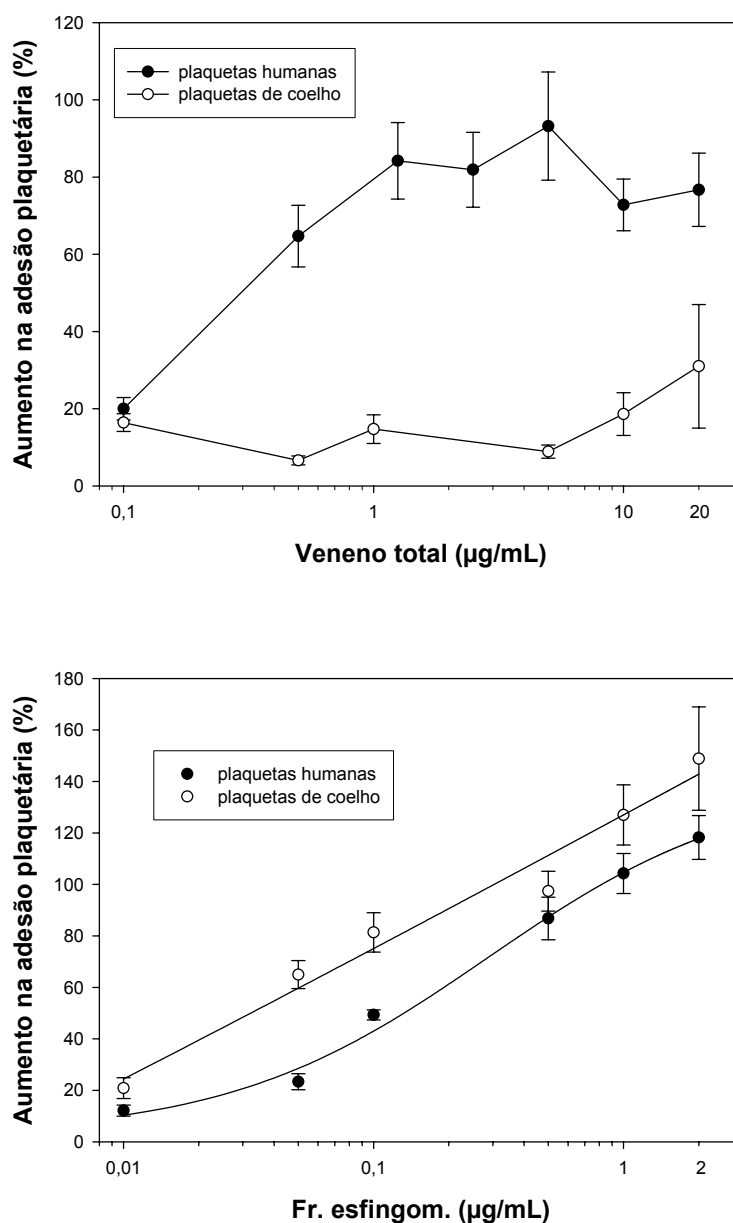


Figura 7 - Adesão plaquetária de PRP de coelho e humano expostos ao veneno total de *L. gaucho* (superior) e de sua fração esfingomielinásica (inferior). Curvas dose-resposta foram analisadas usando uma contagem fixa de plaquetas (coelho: $150 \times 10^9/L$; humano: $75 \times 10^9/L$) com concentrações variáveis de veneno total e fração. Os dados estão expressos como a média \pm e.p.m. (n=5).

4.2 Resultados da obtenção do anticorpo

4.2.1 Títulos de IgG no soro caprino

O procedimento de imunização das cabras com as plaquetas isoladas de coelho mostrou-se eficiente em estimular a produção de anticorpos, conforme mostra a tabela 1, que apresenta os títulos crescentes e de forma gradual da IgG produzida em ambos os animais, como resposta às três imunizações consecutivas de reforço (booster) dadas mensalmente. Dez dias após a terceira imunização de reforço, quando foi realizada a sangria para obtenção de um grande volume sanguíneo, os títulos obtidos no soro dos dois animais foram de 1/25.600 em uma das cabras e de 1/51.200 na outra, repetindo os mesmos valores obtidos na titulação anterior. Uma vez realizado o processo de purificação de todo o soro obtido dos dois animais, as amostras de IgG purificadas foram misturadas e ressuspensas em PBS, apresentando uma concentração protéica final de 120,9 mg/mL.

Tabela 1 - Título do soro das cabras imunizadas para a produção de anticorpos anti-plaqueta de coelhos nos dias 30, 60, 90 e 100 após a primeira imunização.

Imunização e coleta	Cabra 1	Cabra 2
T zero (1ª imunização)	-	-
30 dias (1º booster e coleta)	1/3.200	1/3.200
60 dias (2º booster e coleta)	1/6.400	1/25.600
90 dias (3º booster e coleta)	1/25.600	1/51.200
100 dias (sangria)	1/25.600	1/51.200

4.2.2 Teste para verificação da presença de pirogênio na IgG purificada

Os resultados da temperatura retal nos três coelhos injetados i.v. com uma solução da IgG purificada, diluída em salina estéril e administrada na dose de 10 mg/kg, foram negativos para a presença de possíveis agentes pirógenos. Ao longo das três horas de monitoração, as temperaturas retais dos três animais não sofreram variações significativas. A dose utilizada de 10 mg/kg foi eficaz em induzir a diminuição da contagem plaquetária nos três animais injetados com a IgG purificada. A média da contagem plaquetária nestes animais ao término do teste do pirogênio, após 3 horas da administração da IgG purificada, foi de 26 ± 13 plaquetas/ 10^9 /L (contagem \pm erro padrão da média).

4.2.3 Padronização da quantidade de IgG a ser administrada para indução e manutenção da trombocitopenia - Número de leucócitos, de polimorfonucleares e de mononucleares nos animais trombocitopênicos

Testou-se para a indução da trombocitopenia uma dose maior da IgG do que a aquela utilizada para teste do pirogênio, com o intuito de promover uma redução mais expressiva do número de plaquetas circulantes. A dose de 30 mg/kg da IgG purificada produziu nos três coelhos infundidos com a IgG anti-plaqueta um quadro significativo de trombocitopenia. Nestes animais foram verificadas contagens plaquetárias inferiores a 10×10^9 /L logo na primeira hora após a administração do anticorpo (Tabela 2). Estas baixas contagens plaquetárias se mantiveram em patamares basais até o período de 24 horas após a administração do anticorpo. Com 72 horas, a contagem plaquetária já havia se restabelecido em parte.

O número de leucócitos totais, e especialmente o de polimorfonucleares, flutuou principalmente nas primeiras horas após a administração da IgG. Houve uma queda transitória após 1 hora, seguido de um aumento com 3 horas e retorno para próximo dos níveis do T zero no tempo de 6 horas após a administração do anticorpo, assim permanecendo até o tempo de 24 horas. A flutuação no número de leucócitos deveu-se principalmente às variações na contagem de neutrófilos, uma vez que a contagem de mononucleares apresentou oscilações de menor intensidade.

Tabela 2 - Contagem de plaquetas, leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares, em diferentes tempos, no sangue periférico de coelhos (n=3) infundidos i.v. com a IgG anti-plaqueta na dose de 30 mg/kg. Os dados são os valores médios das contagens \pm erro padrão da média.

Tempos	Plaquetas ($\times 10^9/L$)	Leucócitos ($\times 10^9/L$)	Poli ($\times 10^9/L$)	Mono ($\times 10^9/L$)
T zero	314 \pm 78	5,4 \pm 1,2	3,1 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5
1h	7 \pm 6	2,9 \pm 0,8	0,9 \pm 0,5	2,0 \pm 0,6
2h	5 \pm 3	11,8 \pm 3	7,6 \pm 1,4	4,1 \pm 1,2
4 h	8 \pm 3	8,1 \pm 2,5	4,8 \pm 0,8	3,3 \pm 0,4
6h	5 \pm 4	6,5 \pm 1,7	3,9 \pm 0,9	2,7 \pm 1,1
24h	8 \pm 5	5,7 \pm 2,2	2,3 \pm 1,5	3,5 \pm 0,8
48h	112 \pm 88	7,3 \pm 1,2	4,0 \pm 0,9	3,2 \pm 1,1
72h	238 \pm 112	6,8 \pm 1,4	3,8 \pm 0,6	3,0 \pm 0,8

Poli: polimorfonucleares; mono: mononucleares.

4.3 Resultados dos experimentos com coelhos

4.3.1 Hemograma dos animais experimentais

Os tratamentos experimentais realizados no presente trabalho não causaram alterações expressivas na série vermelha dos animais estudados (tabela 3). Assim, a contagem de eritrócitos, os níveis de hemoglobina e os valores do hematócrito não sofreram alterações estatisticamente significantes frente aos tratamentos com a IgG anti-plaqueta, com o veneno loxoscélico ou com a associação de ambos. Da mesma forma, os índices hematimétricos absolutos (dados não apresentados na tabela 3) também não variaram de modo expressivo em resposta aos diferentes tratamentos utilizados, ao longo dos tempos experimentais investigados.

Os dados do leucograma mostram uma leucopenia observada nos grupos injetados i.d. com o veneno, tanto nos animais trombocitopênicos quanto nos normais, no tempo de 24 horas. Houve diminuição da contagem do número de neutrófilos e linfócitos, neste tempo, no grupo de animais normais injetado com o veneno, não sendo verificadas diferenças estatísticas significativas para os outros tipos leucocitários. No tempo de 120 horas, a contagem do número de monócitos do grupo trombocitopênico experimental esteve mais elevada em relação ao seu respectivo controle. Os dados do grupo trombocitopênico controle mostram que a IgG anti-plaqueta, administrada com seis horas de antecedência à injeção da salina (grupo trombocitopênico normal) não alterou o leucograma destes animais, confirmando os dados obtidos nos testes de padronização da dose da IgG e seus efeitos sobre o leucograma.

Com relação à série plaquetária, além da diminuição almejada do número de plaquetas circulantes nos grupos de animais trombocitopênicos (mantidas em contagens abaixo de $10 \times 10^9/L$ até o tempo de 24 horas), constatou-se uma redução significativa destas células no grupo de animais normais injetados com o veneno, observável nos grupos 24 horas. Os dados de volume plaquetário mostraram-se inversamente proporcionais às contagens plaquetárias. Os valores mais baixos de plaquetas circulantes corresponderam aos maiores volumes plaquetários, como se pode observar pelos dados do volume plaquetário nos grupos de 24 horas.

Tabela 3 - Número de plaquetas, volume plaquetário médio e eritograma parcial de coelhos após os tempos de 4, 24 e 120 horas após a injeção intradérmica de 5 µg do veneno total do veneno de *L. gaucho* em animais trombocitopênicos (Tr Exp) e com contagem normal de plaquetas (N Exp), e de seus respectivos controles

		Plaq	VPM	He	Hb	Ht
	TrExp	7,8±1,52*	12,1±0,98*	5,2±0,31	11,9±0,74	33,8±1,90
	N Exp	226,2±26	6,7±0,92	5,8±0,34	13,4±0,71	37,9±2,18
4h	Tr Ctr	5,2±1,7*	11,7±0,7*	5,4±0,2	12,5±0,1	33,2±0,7
	N Ctr	350,6±45	5,9±0,9	5,8±0,36	13,2±0,41	38,2±1,48
	TrExp	6,8±5,6*	12,4±0,9*	5,5±0,3	12,7±0,5	36,3±1,8
	N Exp	72±13,8	8,62±0,5*	5,4±0,2	12,1±0,4	35,0±2,1
24h	Tr Ctr	7,6±2,9*	10,5±1,2*	5,4±0,4	12,4±0,7	36,7±2,3
	N Ctr	411,2±51,3	4,92±0,3	5,9±0,3	13,1±0,5	40,6±1,1
	Tr Exp	429,5±76,1	4,7±0,3	4,8±0,2	10,9±0,3	33,1±0,8
	N Exp	450,2±41,9	5,2±0,4	5,0±0,4	11,4±0,8	34,3±2,7
120h	Tr Ctr	426,0±55,7	4,5±0,3	5,6±0,4	12,7±0,5	37,8±2,4
	N Ctr	359,6±29,1	5,2±0,5	5,3±0,2	11,9±0,6	36,8±1,4

Plaq: número de plaquetas ($\times 10^9/L$); VPM: volume plaquetário Médio (fL); He: Número de hemácias ($\times 10^{12}/L$); Hb: Hemoglobina (g/dL); Ht: Hematócrito(%); Os resultados expressam média \pm d.p.m de 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo normal controle .

Tabela 4. Leucograma de coelhos após os tempos de 4, 24 e 120 horas após a injeção intradérmica de 5 µg do veneno total do veneno de *L. gaucho* em animais trombocitopênicos (Tr Exp) e com contagem normal de plaquetas (N Exp), e de seus respectivos controles.

		Leuc	Ns.	Nb	Linf	Mon	Ba	Eo
	TrExp	5,9±0,97	3,5±0,77	0,13±0,06	1,8±0,54	0,3±0,11	0,06±0,03	0,05±0,02
	N Exp	6,3±1,13	3,4±0,88	0,12±0,03	2,4±0,549	0,37±0,12	0,14±0,09	0,02±0,02
4h	Tr Ctr	5,7±0,8	2,7±0,5	0,02±0,01	2,3±0,15	0,5±0,18	0,05±0,01	0,07±0,02
	N Ctr	5,3±0,7	1,85±0,85	0,08±0,04	3,1±0,5	0,3±0,06	0,04±0,01	0,06±0,01
	Tr Exp	3,5±0,57*	1,24±0,36*	0,09±0,04	2,2±0,25	0,18±0,02	0,04±0,01	0,02±0,01
	N Exp	2,6±0,33*	1,15±0,17*	0,02±0,01	1,1±0,13*	0,27±0,06	0,03±0,01	0,02±0,02
24h	Tr Ctr	5,7±0,4	1,91±0,1	0,01±0,01	3,5±0,29	0,24±0,07	0,04±0,01	0,04±0,02
	N Ctr	6,6±0,8	2,44±0,19	0,04±0,01	3,78±0,25	0,02±0,04	0,03±0,01	0,06±0,02
	Tr Exp	10,1±1,00	4,86±0,97	0,18±0,08	3,92±0,54	0,75±0,12*	0,09±0,06	0,18±0,08
	N Exp	8,5±0,78	3,97±0,64	0,172±0,08	3,66±0,4	0,56±0,1	0,06±0,03	0,08±0,06
120h	Tr Ctr	5,3±0,4	1,7±0,17	0,02±0,02	3,2±0,28	0,2±0,03	0,03±0,02	0,09±0,02
	N Ctr	7,3±1,0	2,83±0,7	0,08±0,03	3,89±0,64	0,35±0,06	0,08±0,02	0,05±0,02

Leuc: leucócitos totais ($\times 10^9/L$); Ns: Neutrófilos Segmentados ($\times 10^9/L$); Nb: Neutrófilos Bastonete ($\times 10^9/L$); Linf: Linfócitos ($\times 10^9/L$); Mo: Monócitos ($\times 10^9/L$); Eo: Eosinófilos ($\times 10^9/L$); Ba: basófilos ($\times 10^9/L$). Os resultados expressam média \pm d.p.m de 5 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo normal controle.

4.3.2 Fagocitose por polimorfonucleares

Os ensaios *in vitro* da fagocitose por polimorfonucleares mostraram-se eficientes para avaliar a capacidade fagocítica destas células. Separados das demais células sanguíneas a partir do sangue periférico dos coelhos utilizados neste estudo, uma parte destes leucócitos, quantificada através de um *score*, apresentou-se hábil em fagocitar as partículas de zymosan, opsonizadas com a partícula C3b do complemento pela exposição a um pool de soro homólogo. A figura 8 mostra partículas de zymosan fagocitadas por polimorfonucleares de um coelho controle.

Os resultados (fig. 9) não evidenciaram diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos experimentais estudados, ao longo dos tempos analisados. Os tratamentos com a IgG anti-plaqueta, com o veneno, ou com a associação de ambos, não resultaram em aumento ou em diminuição da fagocitose pelos polimorfonucleares.

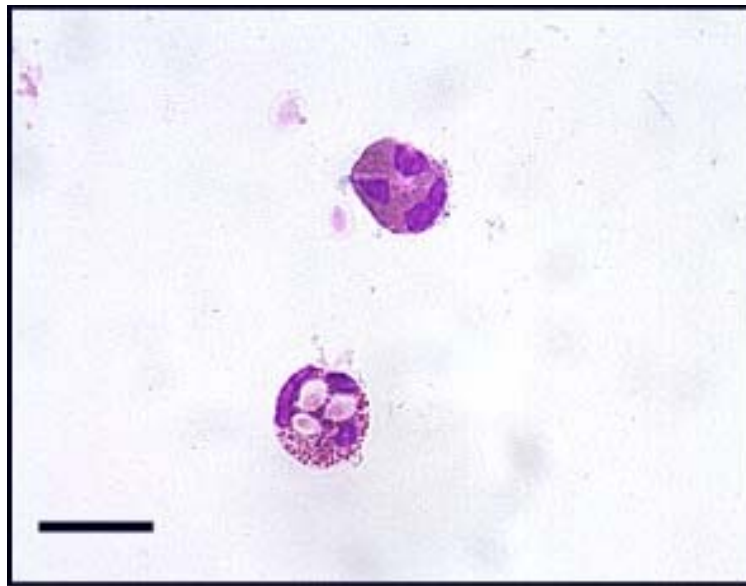


Figura 8 – Polimorfonucleares isolados do sangue periférico de coelho e utilizado em experimento de fagocitose. Na parte inferior, célula apresentando três partículas de zymosan fagocitadas; na parte superior, polimorfonuclear sem partículas internalizadas (escala: 10 μ m).

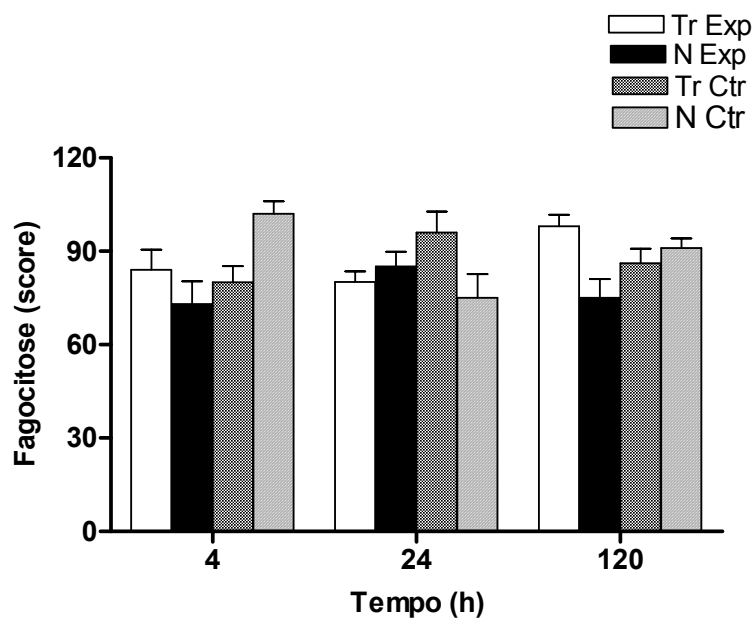


Figura 9 – Fagocitose de partículas de zymosan, opsonizadas pelo C3b presente em pool de soro homólogo, por células polimorfonucleares do sangue periférico, nos tempos de 4, 24 e 120 horas após a injeção i.d. de coelhos injetados i.d. com 5 μ g de veneno total de *L. gaucho* (grupo trombocitopênico experimental: Tr Exp; grupo com contagem plaquetária normal experimental: N Exp) e seus respectivos controles (Tr Ctr e N Ctr).

4.3.3 Níveis plasmáticos de vWF

Como se pode observar na figura 10, os níveis plasmáticos de vWF foram homogêneos nos coelhos submetidos aos diferentes tratamentos, realizados nos grupos experimentais e controles, não sendo constatadas alterações nos diferentes tempos avaliados. Os dados da curva de calibração (não mostrados) indicam que o teste foi sensível em apontar as flutuações desta proteína nas amostras plasmáticas de coelho.

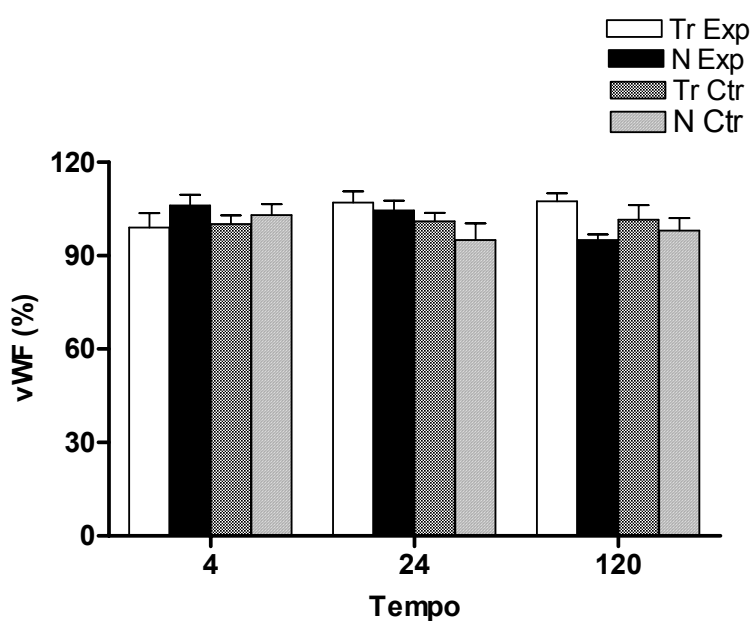


Figura 10 – Níveis de vWF em amostras plasmáticas coletadas nos grupos correspondentes aos tempo de 4, 24 e 120 horas em coelhos injetados i.d. com 5 μ g de veneno total de *L. gaucho* (grupo trombocitopênico experimental: Tr Exp; grupo com contagem plaquetária normal experimental: N Exp) e seus respectivos controles (Tr Ctr e N Ctr).

4.3.4 Tempo de protrombina e tempo de protrombina ativada

Os resultados dos testes de TP e TTPA, presentes na figura 11, utilizados para avaliar respectivamente o funcionamento das vias extrínsecas e intrínsecas do sistema da coagulação, não indicaram nenhuma alteração constatável frente aos tratamentos e tempos avaliados. Os dados de ambos os parâmetros apresentaram-se homogêneos entre si e não revelaram nenhuma diferença entre os valores dos grupos experimentais e controles.

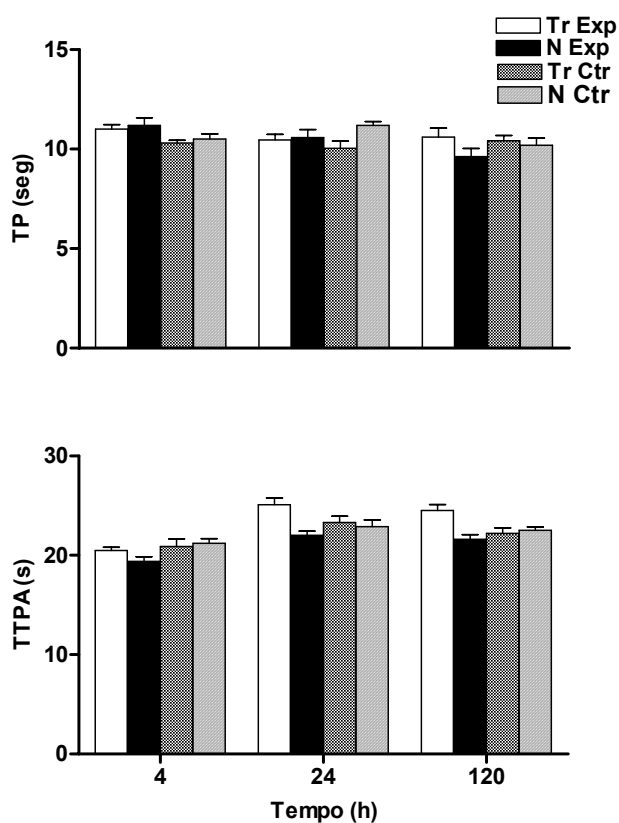


Figura 11 – Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada em amostras plasmáticas coletadas nos grupos correspondentes aos tempo de 4, 24 e 120 horas em coelhos injetados i.d. com 5 µg de veneno total de *L. gaucho* (grupo trombocitopênico experimental: Tr Exp; grupo com contagem plaquetária normal experimental: N Exp) e seus respectivos controles (Tr Ctr e N Ctr).

4.3.5 Análise macroscópica da lesão

A avaliação macroscópica das áreas lesadas nos coelhos injetados com o veneno loxoscélico (fig. 12) mostrou padrões de evolução da lesão dermonecrótica distintos entre os animais trombocitopênicos ou com número normal de plaquetas. Os coelhos trombocitopênicos apresentaram, de uma forma geral, uma difusão mais desorganizada da lesão, com o padrão da progressão sendo mais heterogêneo do que no grupo com contagem normal de plaquetas. Apesar de uma maior variação nos dados, foi possível constatar que animais trombocitopênicos apresentaram áreas maiores da lesão dermonecrótica.

No tempo inicial de 4 horas, todos os animais trombocitopênicos apresentaram pequenas regiões equimóticas, que não foram observadas no animal com contagem plaquetária normal (fig. 12). Neste tempo de 4 horas, os eventos de eritema e edema eram indissociáveis e foram considerados conjuntamente. Com 24 horas, a área de edema aumentou consideravelmente e abrangeu as áreas de edema e equimose. Neste tempo experimental, as áreas de edema, eritema e equimose não foram significativamente aumentadas, apesar dos valores absolutos mais altos nos animais trombocitopênicos em todos os parâmetros avaliados. Por fim, no tempo de 120 horas, as áreas de escaras necróticas foram estatisticamente maiores nos animais depletados de plaquetas.

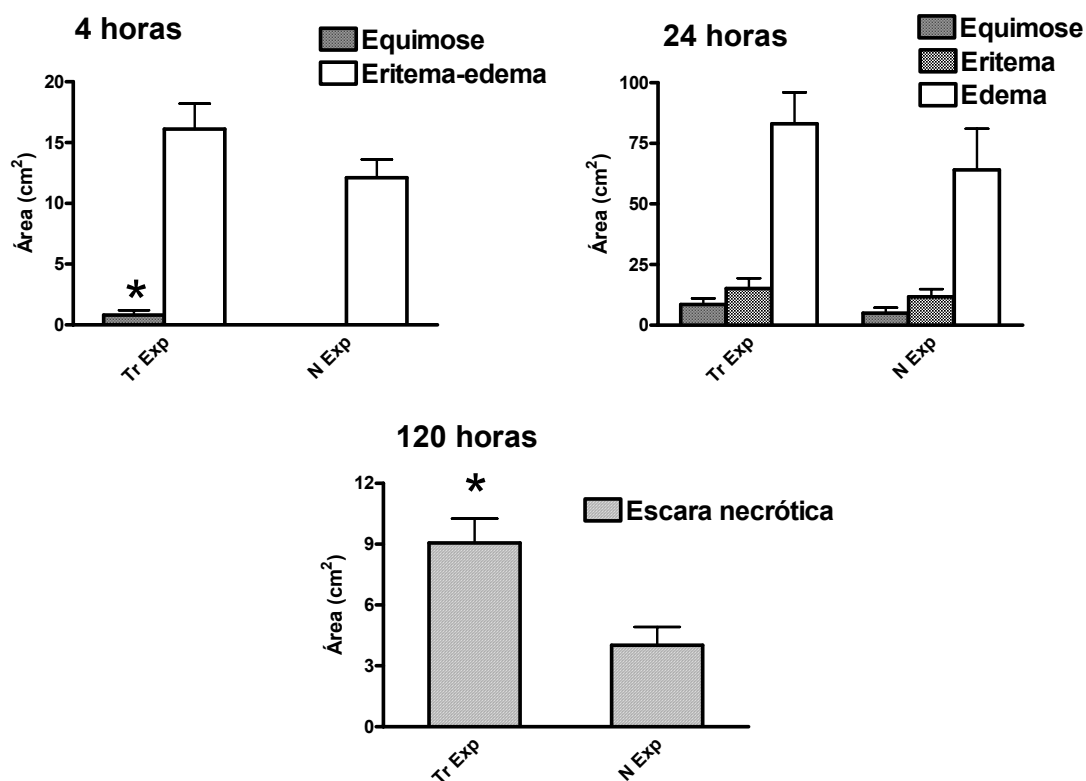


Figura 12 – Regiões macroscópicas de eritema, edema, equimose e de escaras necróticas da lesão dermonecrotica em coelhos injetados com 5 µg de veneno total de *L. gaucho* (grupo trombocitopênico experimental: Tr Exp; grupo com contagem plaquetária normal experimental: N Exp). As áreas acometidas foram medidas e analisadas por meio do programa KS300 (Zeiss). Os resultados expressam média ± e.p.m de 5 animais por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle.

4.3.6 Análise histopatológica da lesão e participação das plaquetas

A análise histológica de fragmentos da pele dos animais injetados com o veneno loxoscélico evidenciou os fenômenos já conhecidos na lesão dermonecrótica do loxoscelismo. A coloração de Fraser-Lendrum permitiu a visualização destes eventos e facilitou a localização dos depósitos de fibrina-plaqueta. Em observações feitas em menor aumento, foi possível analisar campos maiores e visualizar principalmente os fenômenos de hemorragia, de deposição de fibrina e as áreas de escaras necróticas. Nestes animais, no tempo experimental de 4 horas, foram visualizados nas áreas da lesão eventos hemorrágicos mais intensos do que aqueles verificados nos animais com contagem normal de plaquetas, sendo encontradas regiões subjacentes à epiderme com intensa hemorragia. Os animais trombocitopênicos controles não apresentaram áreas hemorrágicas visualizáveis em nenhum dos tempos analisados (fig. 13). No tempo de experimental de 24 horas (fig. 14), a formação de grandes áreas com deposição de fibrina foi encontrada com maior intensidade nos animais trombocitopênicos. Após 120 horas da injeção i.d. do veneno loxoscélico, a formação das escaras necróticas e de extensas áreas subjacentes de infiltrado leucocitário também foram observadas de modo mais intenso nos animais sem plaquetas, quando comparados ao grupo dos animais não depletados experimental. A figura 15 mostra a maior espessura da escara necrótica formada nos animais depletados de plaquetas, com a formação de extensas faixas de infiltrado leucocitário, quando comparado ao animal com contagem plaquetária normal.

Como observado nas figuras 16, 17 e 18, a técnica de coloração de Fraser-Lendrum e a marcação imunohistoquímica para a GPIIb-IIIa foram eficazes em evidenciar a formação de depósitos de fibrina e os agregados plaquetários.

Como mostra a figura 16, a obstrução do vaso na área da lesão dermonecrótica em animal do grupo com número normal de plaquetas ocorreu basicamente pela formação de extensa área de agregados plaquetários. A análise histológica da lesão nos animais trombocitopênicos mostram também a formação de extensos trombos, com intensa deposição de fibrina, entremeada por leucócitos e hemácias. A presença intensa de leucócitos pode ser constatada nas regiões intra e extravasculares em trombo de animal trombocitopênico (fig. 17).

Na figura 18, são mostradas ainda a formação de pequenos agregados plaquetários, participando de modo distinto na composição do trombo (fig. 18 **a**, **b**, **c**, **d**). Em corte histológico da pele de animal depletado (figura 18 **e**) de plaquetas, também se observou em vaso de menor porte trombos formados por fibrina, hemácias e leucócitos, nos quais não se constataram a marcação positiva de agregados plaquetários.

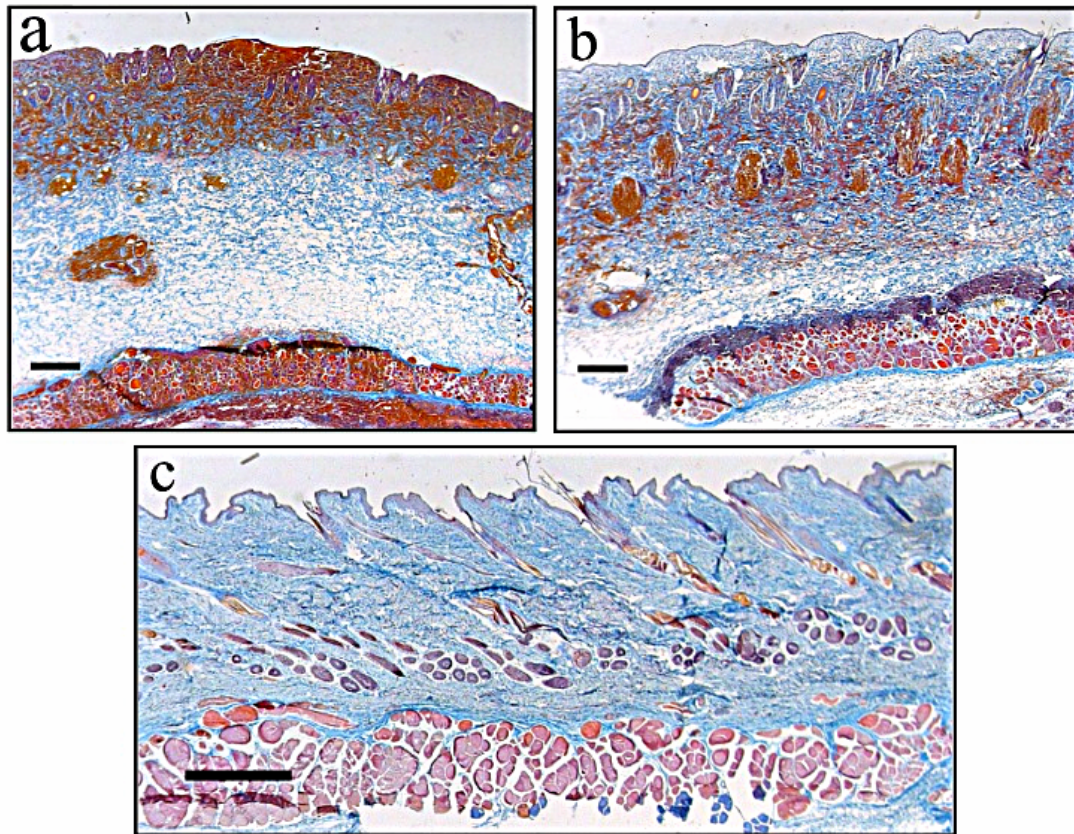


Figura 13 - Micrografias da região da pele de coelhos do grupo trombocitopênico (**a**) e do grupo com número normal de plaquetas (**b**), 4 h após a injeção i.d. de 5 μ g do veneno total de *L. gaucho*. A figura **c** mostra uma região da pele de animal trombocitopênico controle injetado i.d. com salina. Utilizou-se a coloração de Fraser-Lendrum, que permite a coloração em azul das fibras colágenas e elásticas, e em laranja dos eritrócitos. Na figura **a** observa-se uma hemorragia mais intensa do que a verificada na figura **b** (escala: 500 μ m).

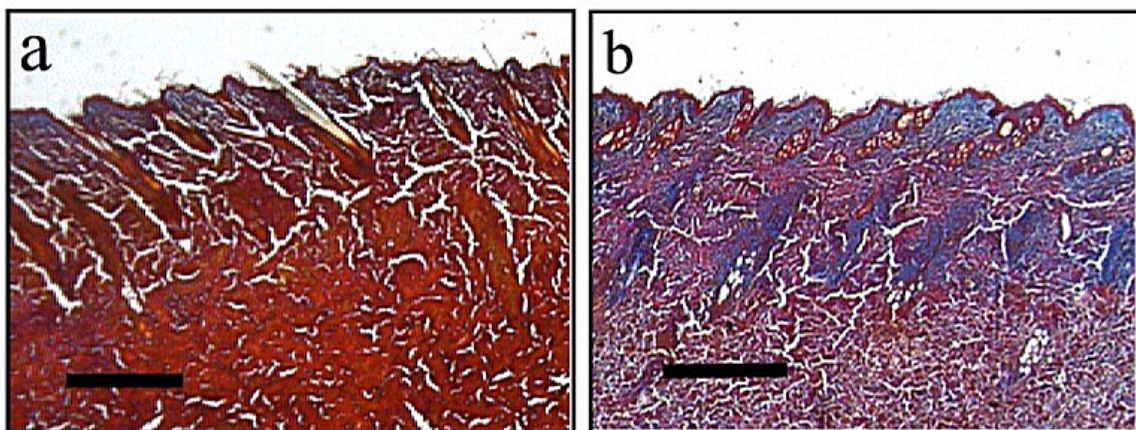


Figura 14 - Micrografias da região da pele de coelhos do grupo trombocitopênico (**a**) e do grupo com número normal de plaquetas (**b**), 24 h após a injeção i.d. de 5 μ g do veneno total de *L. gaucho*. Utilizou-se a coloração de Fraser-Lendrum, que permite a visualização em tonalidade vermelha das áreas de deposição da fibrina. Na figura **a** nota-se uma deposição mais intensa de fibrina do que na figura **b** (escala: 500 μ m).

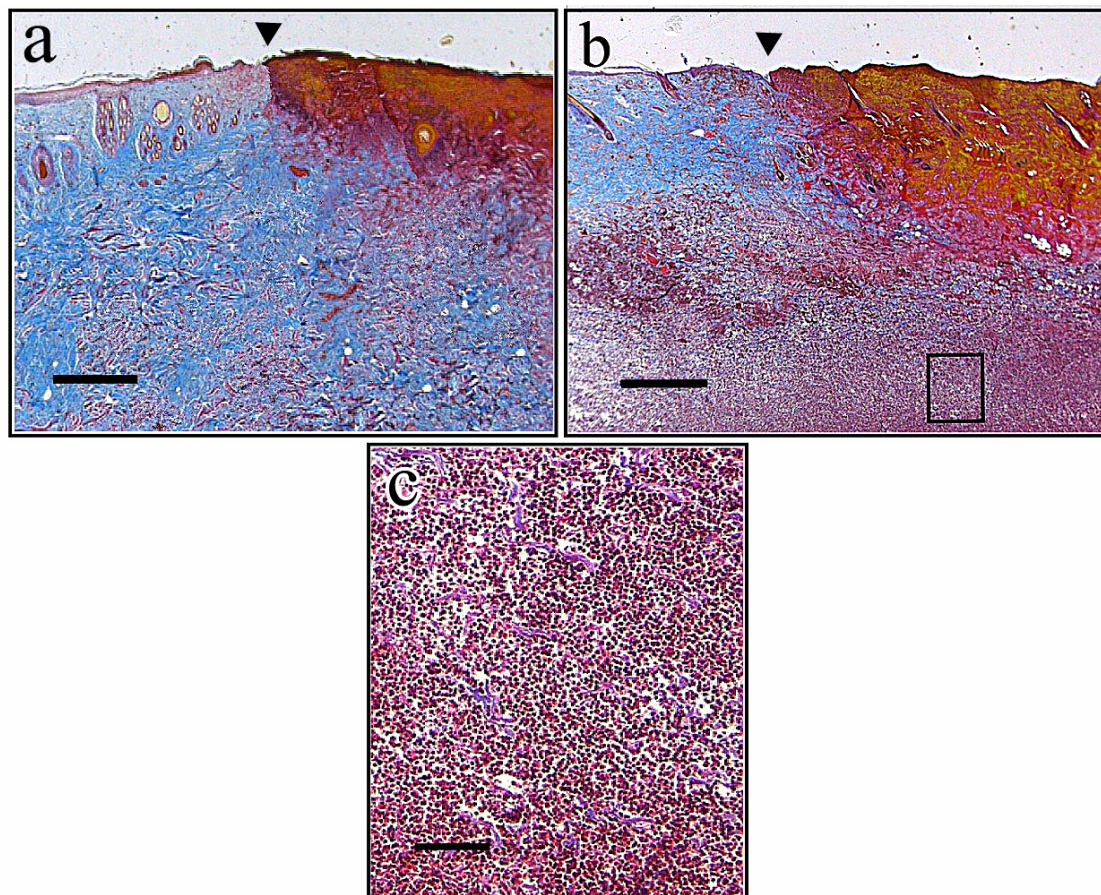


Figura 15 – Micrografias da região de formação da escara necrótica em coelhos do grupo com número normal de plaquetas (**a**) e em coelho do grupo trombocitopênico (**b**), 120 h após a injeção i.d. de 5 μ g do veneno total de *L. gaucho*. A coloração de Fraser-Lendrum mostra a escara necrótica, visualizável por sua coloração castanho-amarelada. A coloração em azul mostra as fibras colágenas e elásticas. As setas apontam para a borda superficial das lesões. A tonalazul das fibras colágenas e elásticas. Na figura **b**, nota-se a presença de uma escara mais espessa do que a verificada na figura **a**. A figura **c** mostra em maior aumento uma região do infiltrado inflamatório assinalado na figura **b** (escala: 1 mm).

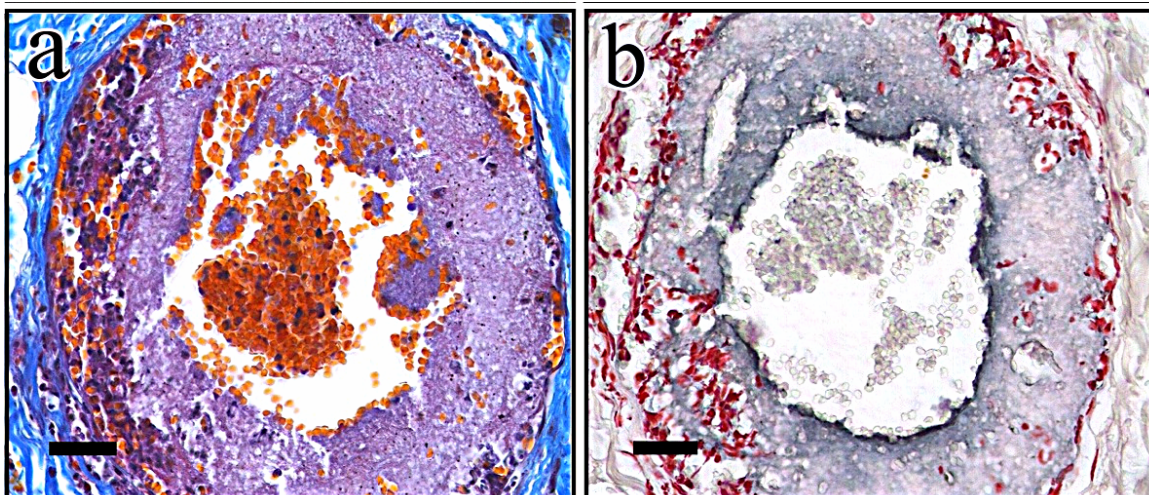


Figura 16 - Micrografias de cortes histológicos seqüenciais mostrando vasos da derme, com presença de trombo intraluminal, na região da lesão dermonecrótica induzida experimentalmente, 4 h após a injeção de 5 μ g do veneno de *L. gaucho* em coelho do grupo com número normal de plaquetas. A figura **a** mostra corte histológico corado pelo método de Fraser-Lendrum e a figura **b** corte histológico submetido à reação imuno-histoquímica para a revelação de agregados plaquetários. A coloração de Fraser-Lendrum permite uma coloração diferenciada da plaqueta na ausência de redes de fibrina, conferindo a estas células uma tonalidade púrpura-violácea. É possível constatar que a luz deste vaso sofreu uma deposição radial de intenso agregado plaquetário, ocupando todo o perímetro vascular. A marcação imunohistoquímica mostra uma tonalidade escurecida proporcional à intensidade de formação do agregado, compondo um halo escurecido que delimita a luz do vaso (escala: 30 μ m).

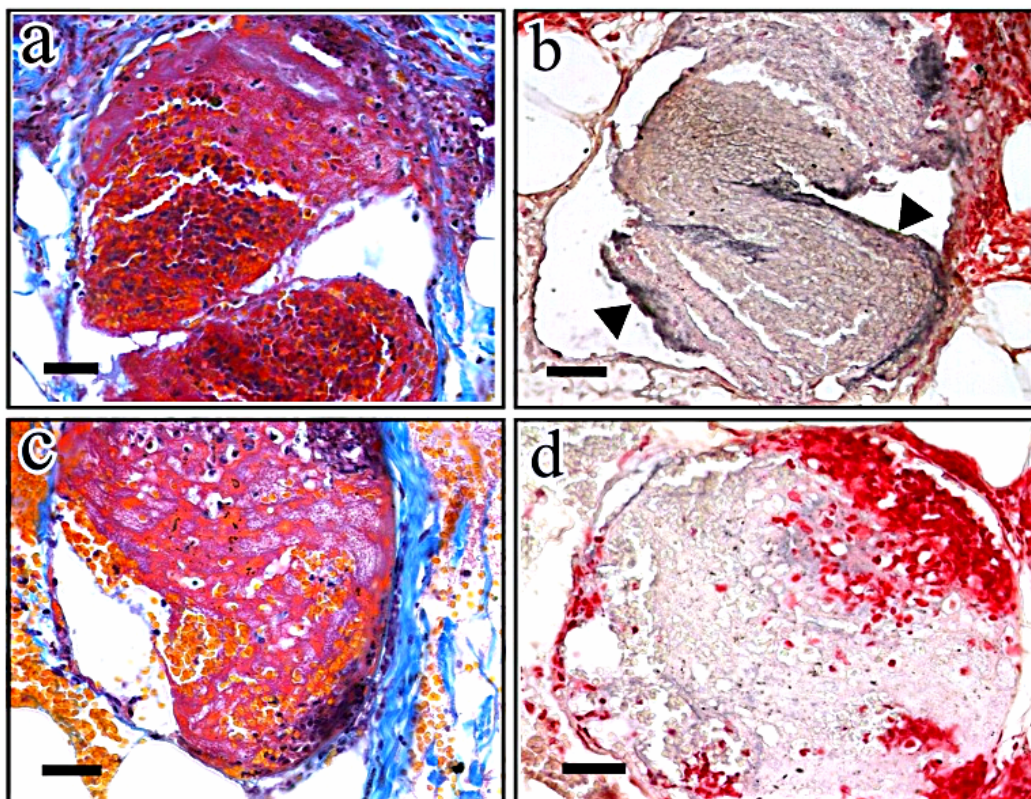


Figura 17 - Micrografias de cortes histológicos seqüenciais mostrando vasos da derme, com presença de trombos intraluminais, na região da lesão dermonecrótica, 4 h após a injeção i.d. de 5 μ g do veneno de *L. gaucho* em animal do grupo com número normal de plaquetas (**a** e **b**) e em animal do grupo trombocitopênico (**c** e **d**). Os cortes **a** e **c** foram corados pelo método de Fraser-Lendrum e os **b** e **d** foram submetidos a reações imuno-histoquímicas para a revelação de agregados plaquetários. A coloração pelo método de Fraser-Lendrum evidencia, em vermelho, a intensa deposição de fibrina nos trombos, tanto em animal normal (**a**) quanto em animal trombocitopênico (**c**). A revelação em tonalidade escura dos agregados plaquetários (setas) na reação imuno-histoquímica pode ser notada em regiões periféricas do trombo mostrado em animal normal (**b**). Na figura **d** se evidencia no trombo a presença de núcleos de leucócitos, corados em vermelho, em regiões extra e intravasculares (escala: 40 μ m).

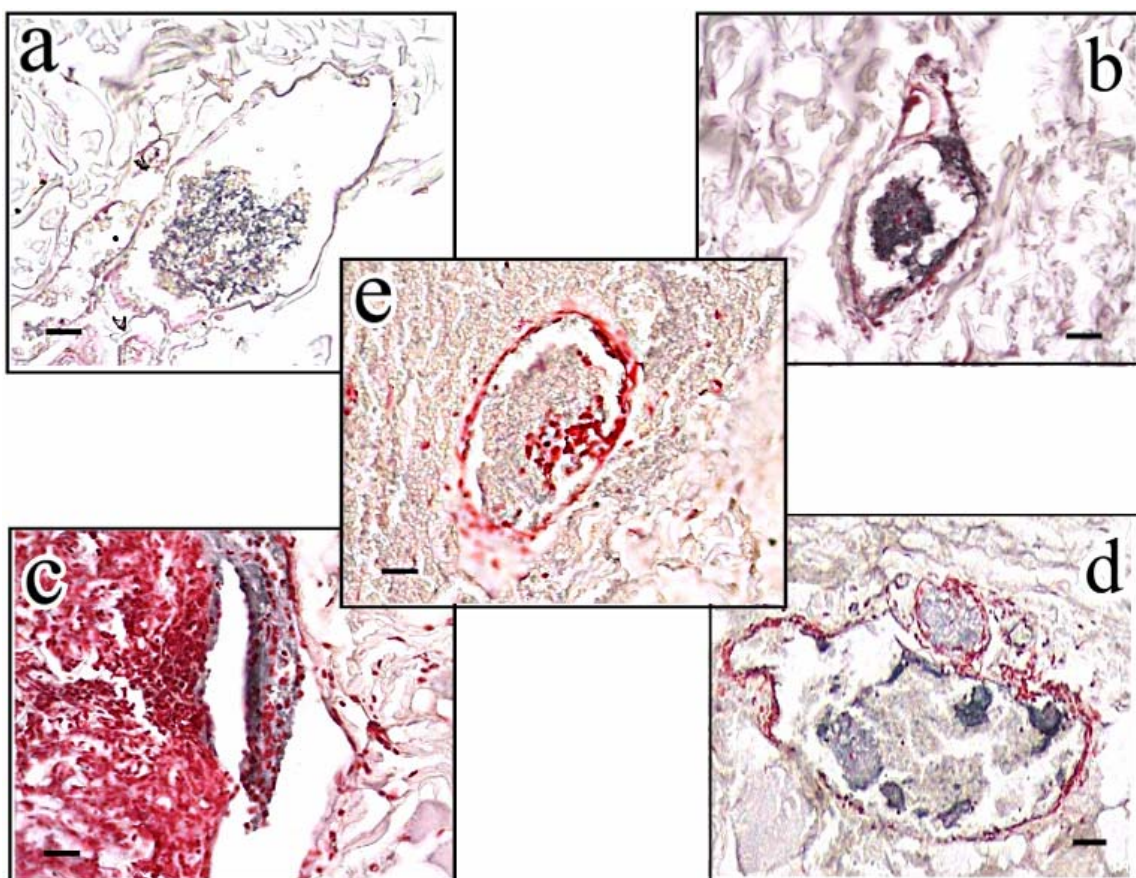


Figura 18 - Micrografias mostrando a presença de trombos intraluminais em vasos da derme de coelhos com número normal de plaquetas (**a**, **b**, **c**, **d**) e de coelho trombocitopênico (**e**), após 4 horas da injeção de 5 μ g do veneno loxoscélico. A tonalidade mais escurecida corresponde à marcação positiva das plaquetas. Notar que a intensidade da marcação é proporcional à densidade dos agregados plaquetários, como pode ser observado pela presença esparsa de plaquetas, entremeadas por hemácias, no interior do vaso (**a**). É possível identificar diferentes disposições e interações dos agregados plaquetários dentro da luz venosa, com formação de intensos agregados plaquetários no centro do vaso (**b**), em associação com leucócitos (**c**), ou em agregados esparsos (**d**). No centro, está um trombo formado sem a marcação positiva de plaquetas (**e**) (escala: 20 μ m).

6 DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, o número de acidentes notificados envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* tem aumentado consideravelmente em algumas regiões do Brasil e também em outras partes do globo. Apesar de existir atualmente uma série de informações biológicas e epidemiológicas que facilitam o diagnóstico destes acidentes, especialmente nas regiões de alta incidência destes casos, muitos aspectos fisiopatológicos da ação do veneno loxoscélico permanecem ainda pouco estudados, desconhecendo-se a importância e a participação de determinados sistemas e tipos celulares na patogênese do loxoscelismo.

Na presente investigação, estudou-se a interação entre a plaqueta e o veneno loxoscélico em duas abordagens: uma visando caracterizar a ação *in vitro* do veneno loxoscélico sobre as plaquetas humanas e de coelhos, permitindo desta forma avaliar os efeitos deste veneno sobre as principais funções plaquetárias; a outra buscando avaliar o papel desempenhado pela plaqueta perante a ação local do veneno loxoscélico na derme, através de um modelo experimental de trombocitopenia.

Embora alguns estudos tenham investigado os efeitos *in vitro* do veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* sobre plaquetas humanas (KURPIEWSKI et al., 1981; REES et al., 1988; DA SILVEIRA et al., 2006), não existem até o momento relatos na literatura que abordem a ação *in vitro* de venenos loxoscélicos sobre plaquetas de coelho, que é o principal modelo para o estudo da lesão dermonecrótica. Desta forma, antes de iniciarmos os estudos experimentais com o modelo trombocitopênico, o ponto inicial deste estudo foi a determinação *in vitro* dos efeitos do veneno de *Loxosceles gaucho* e de seu principal componente, a fração esfingomielinásica, sobre as funções plaquetárias de agregação, adesão e ativação.

Os resultados de agregação plaquetária que obtivemos confirmam para o veneno de *L. gaucho* a propriedade pró-agregante já descrita para o veneno total e para a fração esfingomielinásica de *L. reclusa* (REES et al., 1988), e também para o veneno de *L. intermedia* (DA SILVEIRA et al., 2006). Neste último, isoformas clonadas da fração esfingomielinásica apresentaram uma menor efetividade, quando comparadas aos nossos dados, em induzir a agregação de plaquetas humanas, uma vez que foi necessária uma concentração de 10 µg/ml da proteína clonada para produzir uma resposta de agregação em

PRP humano próxima a 50%. Comparativamente, nossos resultados evidenciam que foi necessária uma concentração cinco vezes menor da fração esfingomielinásica isolada do veneno total de *L. gaucho* para produzir uma resposta de agregação de magnitude semelhante em PRP humano. Comparados aos resultados obtidos por KURPIEWSKI et al. (1981) com o veneno total de *L. reclusa*, que utilizaram altas concentrações de veneno (130 µg/mL) para a obtenção de uma resposta de agregação de cerca de 80 %, nossos resultados também mostraram que o veneno total de *L. gaucho* foi capaz de produzir uma resposta expressiva de agregação, próximo a 70% de transmitância, utilizando-se uma concentração de veneno total de 20 µg/mL. Dessa forma, podemos sugerir que o veneno de *L. gaucho*, bem como sua fração esfingomielinásica, tem maior ação agregante plaquetária do que os venenos das espécies referidas.

De modo geral, a plaqueta humana foi mais sensível ao veneno total e à sua fração do que a plaqueta de coelho, uma vez que a agregação foi mais expressiva na primeira. No PRP de coelho foi necessária uma concentração duas vezes maior do veneno total para a indução de respostas de agregação de magnitude semelhante às verificadas no PRP humano. Adicionalmente, uma concentração duas vezes maior da fração esfingomielinásica no PRP de coelho ainda não foi suficiente para induzir uma agregação da mesma ordem que aquela observada para o PRP humano.

A exposição das plaquetas humanas e de coelhos ao veneno total não resultou na liberação aumentada de LDH, como mostraram os ensaios que medem a atividade desta enzima no plasma. Assim, esse resultado evidencia que o veneno total não promove a lise plaquetária. Em ocorrendo lise, esta seria capaz de produzir um aumento da transmitância (passagem de luz) no PRP. Os dados aqui obtidos descartam que esse fenômeno possa estar ocorrendo, o que poderia ser interpretado como um falso resultado de agregação.

Uma importante constatação e que corrobora com observações anteriores feitas a partir de estudos com o veneno de *L. reclusa* (REES et al., 1988) é a necessidade de componente(s) plasmático(s) para que o veneno possa induzir a agregação plaquetária, uma vez que esta não ocorreu na suspensão que continha as plaquetas lavadas (SPL). Nesta, somente foi possível observar a mudança de forma, constatável pelo decréscimo da passagem de luz pelo sistema, que indica que um processo de ativação plaquetária foi

iniciado, mas não de forma suficiente para a indução do processo de agregação, que ocorre após a mudança de forma das plaquetas.

Da mesma forma, REES et al. (1988) apontaram a presença da proteína C-reativa como requisito para a agregação plaquetária, mas outras possibilidades são atualmente consideradas, como a presença da molécula de lisofosfatidilcolina (LPC), presente no plasma de forma livre ou ligada à albumina. Essa molécula serviria de substrato para a atuação da esfingomielinase presente no veneno loxoscélico, que ao hidrolisar o LPC gera o ácido lisofosfatídico (LPA), molécula capaz de elicitar importantes eventos celulares, dentre os quais a agregação plaquetária (HASERÜCK et al., 2004; SIESS & TIGY, 2004). A capacidade das esfingomielinases presentes nos venenos loxoscélicos de gerar ácido lisofosfatídico já é conhecida há algum tempo (KURPIEWSKI et al., 1981), e esta atividade tem sido confirmada através da clonagem de isoformas destas enzimas, presentes nos venenos de diferentes espécies do gênero *Loxosceles* (VAN METEREN et al., 2003; LEE & LINCH, 2005). Em conjunto, esses dados indicam a importância dos componentes plasmáticos no mecanismo de agregação plaquetária induzido pelo veneno loxoscélico. A identificação do(s) componente(s) plasmático(s) auxiliaria a destrinchar o mecanismo de ação pelo qual o veneno loxoscélico induz a agregação plaquetária. Ainda, a possibilidade da participação do LPA deve ser levada em consideração em estudos futuros.

O veneno de *L. gaucho* foi capaz de ativar as plaquetas utilizadas em nossas condições experimentais, como mostra o aumento da expressão de LIBS1. A exposição deste epítipo é induzida pelas mudanças conformacionais da principal glicoproteína plaquetária, no momento em que seu sítio de ligação é ocupado por ligantes (FREELINGER et al., 1990; GINSBERG et al., 1990; RAND et al., 1999). O aumento da expressão de LIBS1 já foi descrito em condições patológicas que induzem a ativação das plaquetas circulantes (GAWAZ et al., 1995a; b). Assim, o aumento da expressão deste epítipo sobre a superfície das plaquetas humana e de coelho incubadas com o veneno total em PRP mostradas nos nossos resultados confirmam que o veneno de *L. gaucho* é capaz de causar a ativação das plaquetas de ambas as espécies.

Já em relação à GPIIb-IIIa, a exposição das plaquetas ao veneno loxoscélico não foi capaz de gerar um aumento na expressão desta glicoproteína. Como já era esperado, a intensidade da marcação da IgY anti-GPIIb-IIIa foi mais intensa nas plaquetas de coelhos

do que nas de humanos, o que se explica pelo fato deste anticorpo ter sido produzido com a GPIIb-IIIa de coelho, sendo este mais sensível à proteína nesta espécie. Apesar disso, SANTORO et al. (2004) descreveram este anticorpo como sendo hábil em reconhecer a GPIIb-IIIa humana, além de apontar que plaquetas de coelho ativadas por trombina apresentam significativo aumento na sua expressão. Desta forma, podemos constatar que a ativação plaquetária induzida pelo veneno loxoscélico foi capaz de provocar uma mudança conformacional na estrutura da GPIIb-IIIa e o conseqüente aumento da exposição do epítopo LIBS1. Entretanto, essa ativação não foi suficiente para causar o deslocamento da GPIIb-IIIa presente na superfície dos grânulos plaquetários para a membrana, não permitindo assim o aumento na expressão desta proteína.

A P-selectina é um outro marcador utilizado em estudos da ativação plaquetária (REED et al., 1998; SANTORO; SANO-MARTINS, 2004; MCGREGOR et al., 2006). Os resultados mostram que o veneno total de *L. gaucho* causou o aumento da sua expressão sobre a superfície de plaquetas de coelhos, mas não em plaquetas humanas. É importante ressaltar que foram utilizados dois anticorpos monoclonais, específicos para cada espécie, ao contrário do anticorpo anti-LIBS1. Ainda, é plausível considerar que a ativação em plaqueta humana induzida pelo veneno total pode não ter sido suficientemente intensa para promover o aumento da expressão desta importante molécula de adesão na superfície plaquetária, uma vez que esta é menos parece ser menos sensível à ação do veneno. Sob as nossas condições experimentais, as concentrações da fração esfingomielinásica aqui empregadas, para as plaquetas humanas e de coelhos, não causaram aumento significativo na marcação de nenhum anticorpo utilizado. Portanto, os dados sugerem que o veneno, apesar de induzir a ativação plaquetária, não a causou em plaquetas humanas em intensidade suficiente para promover o deslocamento da P-selectina dos grânulos citoplasmáticos para a membrana plaquetária, da mesma forma que propusemos para a GPIIb-IIIa.

Em relação a adesão plaquetária os dados obtidos mostram a aplicabilidade deste teste também para as plaquetas de coelho. Os dados da curva padrão para as duas espécies, apresentando boa correlação entre a contagem plaquetária e a atividade fosfatásica, confirmam os relatos prévios para as plaquetas humanas (ERICKSSON & WHISS, 2005) e validam o presente protocolo para se investigar a adesão plaquetária em PRP de coelho.

Os ensaios de adesão mostraram que as plaquetas destas duas espécies podem responder de forma expressiva quando incubadas com o veneno total ou com sua fração. Considerando-se a atividade do veneno total, os dados mostraram que as plaquetas humanas aderiram mais do que as de coelho. Porém, a fração esfingomielinásica provocou um efeito inverso, uma vez que plaquetas de coelho foram mais responsivas a esta fração do que as humanas. O componente esfingomielinásico causou no PRP de ambas as espécies um aumento dose-resposta no percentual de adesão plaquetário, ao contrário da resposta irregular apresentada pelas plaquetas das duas espécies frente ao estímulo com o veneno total. Possivelmente, a existência de muitos componentes, como o amplo arsenal enzimático de hialuronidases, fosfatases e fosfolipólases (FUTRELL, 1992; HOGAN et al., 2004; da SILVA et al., 2004), poderia, apesar do aumento observado na adesão plaquetária, estar interferindo na regularidade da função adesiva das plaquetas ao colágeno, bloqueando desta forma a construção de uma curva dose-resposta.

As diferenças inter-espécies podem ser cruciais para que um determinado fenômeno patológico ocorra, como se verifica por exemplo na diferença de comportamento da série vermelha de diferentes espécies frente ao veneno loxoscélico. Enquanto o veneno loxoscélico é capaz de promover a hemólise *in vitro* em hemácias humanas (TAMBOURGI et al., 1995), investigações têm mostrado que o mesmo fenômeno não é observado em hemácias de coelhos (FUTREL et al., 1979).

Desta forma, constata-se que diferentes modelos experimentais podem ter respostas fisiopatológicas díspares aos estímulos do veneno. De modo contrário ao comportamento verificado para a série vermelha, os resultados que ora apresentamos ressaltam que o veneno loxoscélico, em condições *in vitro*, atua de forma semelhante sobre as plaquetas humanas e de coelho e é capaz de ativá-las, promovendo desta forma os fenômenos da agregação e da adesão.

O desenvolvimento da parte experimental deste trabalho foi precedido pela etapa de preparação do anticorpo anti-plaqueta. Os procedimentos para a separação destas células e o protocolo de imunização utilizado nos espécimes de caprinos foram satisfatórios em estimular o sistema imunológico destes animais para a produção almejada da IgG anti-plaqueta. Os títulos crescentes da IgG produzida pelas cabras foram constatados através de titulação realizada por ELISA e mostram que a resposta imunológica nos dois animais foi

capaz de produzir níveis expressivos daqueles anticorpos. Os procedimentos seguintes visaram a purificação desta IgG e posteriormente a padronização da dose necessária para induzir um quadro expressivo de trombocitopenia e, finalmente, de mantê-lo pelo período mínimo de 24 horas.

Nos experimentos preliminares, realizados para testar a eficácia da IgG em depletar o nível de plaquetas circulantes, constatou-se que os coelhos estavam apresentando reações adversas à administração do anticorpo, como mioclonia branda, rubor no pavilhão auricular e hipertermia. Avaliou-se então se este quadro febril poderia estar associado à presença de substâncias pirogênicas, que são contaminantes bacterianos que provocam febre, de modo especial o lipopolissacarídeo (LPS) de parede bacteriana (HORI et al., 2000; ROTH et al., 2001). Como o teste foi negativo para a presença de substâncias pirogênicas, a provável causa das reações adversas seria a formação de imunocomplexos, que podem ocorrer quando um anticorpo é rapidamente administrado em altas concentrações. A partir de então, com a adoção da administração lenta e da diluição adequada da IgG, não foram mais constatadas as reações adversas verificadas na administração dos anticorpos.

A geração de fragmentos do complemento, importantes para a quimiotaxia leucocítica, pode também estar relacionada com a leucocitose transitória por nós observada, uma vez que estes fragmentos ativados possuem uma curta meia-vida na circulação. Esse é, por exemplo, o caso do fragmento C5a, que tem uma meia-vida de apenas 3 minutos (WEISDORF et al., 1981). Desta forma, a normalização do nível de leucócitos circulantes, poucas horas após a administração do anticorpo, aliada aos resultados normais que obtivemos para a fagocitose, indicam que a administração do anticorpo não promoveu alterações drásticas e duradouras no sistema de defesa dos animais trombocitopênicos. Portanto, a adoção do intervalo de 6 horas entre a administração do anticorpo e a injeção i.d do veneno loxoscélico, além de permitir a estabilização do número de leucócitos circulantes, representou também uma margem de segurança visando minimizar as possíveis interferências do sistema complemento sobre o desenvolvimento da lesão dermonecrotica.

O tratamento dos coelhos com a IgG caprina obtida e a indução da trombocitopenia não ocasionou quadros hemorrágicos perceptíveis, como é possível constatar pelos dados inalterados do eritrograma dos animais trombocitopênicos, tanto no grupo desafiado com o veneno quanto no seu respectivo controle. Os valores do eritrograma mostram que não

houve alterações constatáveis na série vermelha, bem como não há indícios, pelos dados dos índices hematimétricos absolutos, de uma resposta regenerativa da medula a uma eventual anemia. Por fim, o sistema da coagulação dos coelhos trombocitopênicos não se alterou com a condução do protocolo experimental, como pode ser observado pelos valores homogêneos do TP e TTPA em todos os grupos. Uma eventual alteração no sistema de coagulação dos animais trombocitopênicos poderia interferir no objetivo de avaliar o papel da plaqueta na formação de trombos na lesão dermonecrótica.

A quantidade de veneno utilizada nos presentes experimentos, de 5 µg de veneno total por animal, objetivou induzir a formação de uma lesão dermonecrótica moderada, que permitisse a análise comparativa do desenvolvimento da lesão em animais trombocitopênicos e também em animais com contagem plaquetária normal. Em outros trabalhos, também foram empregadas quantidades iguais ou até mesmo menor do que 5 µg de veneno loxoscélico para o estudo da lesão (GUILHERME et al., 2001; PAIXAO-CAVALCANTE et al., 2006).

Como observado, os animais com número normal de plaquetas, injetados i.d. com a dose de 5 µg do veneno total, além da lesão desenvolveram um quadro de leucopenia e de trombocitopenia, porém menos intensos do que os relatados para a dose de 30 µg de nossa investigação anterior (TAVARES et al, 2004). O envolvimento destas células no local da lesão pelas atividades diretas e indiretas do veneno pode explicar, ao menos em parte, os decréscimos na contagem de leucócitos e plaquetas. No caso específico do decréscimo da plaqueta, a sua circulação pelo leito vascular da região sob os efeitos do veneno poderia causar pequenas modificações estruturais da membrana, ou mesmo sua ativação parcial, como foi demonstrado pelos nossos resultados *in vitro*. Adicionalmente, esse processo de ativação pode acarretar em proteólise dos receptores de membrana, pela perda de ácido siálico e/ou pela expressão de fosfatidilserina na superfície plaquetária (RAND et al., 1999), o que favoreceria o seu reconhecimento e a sua retirada da circulação pelo sistema mononuclear fagocitário.

Em relação ao quadro leucocitário nos animais trombocitopênicos, os achados de monocitose no leucograma, após 120 horas da injeção do veneno, podem estar relacionados à maior intensidade da lesão do que aquele verificado no animal com contagem normal, uma vez que neste a lesão foi menor e não se constatou o quadro de monocitose. A espota

de cronificação da lesão, ou mesmo o processo de resolução de uma extensa área de tecido necrosado por segunda intenção podem favorecer um perfil de monocitose também no sangue periférico. O mesmo quadro de monocitose foi verificado em trabalho experimental do nosso grupo em que se utilizou uma quantidade de cerca de seis vezes maior do veneno total (TAVARES et al., 2004). É importante destacar que a ausência das plaquetas só pode ser efetivamente considerada para os eventos agudos da formação da lesão, uma vez que o nível de plaquetas circulantes já se encontrava em elevação após as 48 horas da administração do anticorpo, como verificado pelos experimentos para a padronização da quantidade de IgG a ser administrada. Em face disto, pode-se considerar que a etapa de reparo tecidual da lesão já acontecera na presença das plaquetas. Portanto, a grande influência da depleção plaquetária se deu nas etapas iniciais do processo lesivo desencadeado pelo veneno loxoscélico.

Os decréscimos ora verificados nas contagens plaquetárias foram acompanhados da elevação do VPM, tanto nos animais trombocitopênicos experimentais ou controles, quanto nos animais envenenados que apresentaram também queda na contagem plaquetária. Após a administração do anticorpo anti-plaqueta, o número de plaquetas caiu para níveis bastante reduzidos e as plaquetas circulantes apresentaram um aumento no VPM de cerca de três vezes, transcorridos 24 horas da infusão do VPM. Os valores de VPM nos animais normais injetados com o veneno loxoscélico aumentaram com menor intensidade, acompanhando o menor decréscimo na contagem plaquetária. Investigações com plaquetas têm mostrado que a elevação do VPM precede a elevação da contagem plaquetária (CORASH et al., 1987). Da mesma forma que no presente trabalho, KUTER & ROSENBERG (1994) desenvolveram um modelo de trombocitopenia em coelhos a partir de anticorpos também produzidos em cabra. Nesta investigação, o aumento do VPM também foi condizente com o decréscimo plaquetário. Com relação à serie eritrocitária e leucocitária, esses mesmos autores não relataram flutuações expressivas nestas linhagens, indicando que a administração do anticorpo anti-plaqueta não causou alterações sistêmicas expressivas em coelhos, do ponto de vista hematológico, corroborando portanto com nossos achados.

Em relação à funcionalidade dos neutrófilos, os resultados de fagocitose evidenciam que as células polimorfonucleares na circulação não sofreram interferências dos tratamentos com o veneno ou com a IgG. Apesar dos indícios de envolvimento inicial da

linhagem neutrofílica, após as primeiras horas da administração da IgG os polimorfonucleares já apresentavam níveis normais de fagocitose, e não foram constatadas diferenças entre os diferentes grupos.

A dosagem de vWF plasmático também não apresentou modificações nos seus níveis circulatórios. Seu aumento na circulação tem sido utilizado como marcador da ativação e da lesão endotelial, que é um reservatório natural desta proteína (JIMENEZ et al., 2003). Os níveis inalterados de vWF indicam que a lesão endotelial causada pelo veneno loxoscélico não foi suficiente para aumentar os seus níveis circulatórios. É possível que a lesão produzida por doses mais elevadas do veneno promovam aumentos perceptíveis nos níveis de vWF. De qualquer modo, os dados indicam que a administração da IgG também não causou alteração em células endoteliais que implicasse na elevação dos níveis desta proteína.

O funcionamento do sistema da coagulação foi verificado através dos testes de TP e TTPA. O primeiro avalia a via intrínseca, enquanto o segundo a via extrínseca. Pelos dados inalterados e homogêneos destes dois testes, fica evidenciado que o veneno e a condição de trombocitopenia causada pela IgG não causaram alterações significativas no sistema da coagulação como um todo.

A evolução da lesão dermonecrótica causada pelo veneno de espécies do gênero *Loxosceles* envolve um complexo entrelaçamento de eventos moleculares e celulares. Como mostramos aqui, os resultados *in vitro* não deixam dúvida a respeito da capacidade deste veneno em elicitar nas plaquetas os fenômenos de agregação, adesão e ativação. Entretanto, é importante ressaltar que estas células podem ser acionadas e ativadas a partir de interferências indiretas do veneno loxoscélico, que mostra atividade sobre uma grande variedade de células e substratos. A célula endotelial, por exemplo, é bastante sensível à ação de diferentes venenos loxoscélicos (PATEL et al., 1994; GOMEZ et al., 1999; DESAI et al., 2000; VEIGA et al., 2001). Outros tipos celulares têm sido também apontados como alvos do veneno, como fibroblastos (VAN MEETEREN et al., 2007) e queratinócitos (MÁLAQUE et al., 1999). Desta forma, a ativação ou mesmo o dano destas células pelo veneno pode ser um potente modo de ativar indiretamente *in loco* as plaquetas circulantes. Ainda, a capacidade de certas frações do veneno de degradar componentes da matriz extracelular, como a fibronectina, e componentes plasmáticos, como o fibrinogênio

(FEITOSA et al., 1998; VEIGA et al., 1999), representam potenciais vias de ativação indireta da plaqueta.

Nos experimentos *in vivo* com os animais com contagem plaquetária normal, ficou evidente por meio das colorações para fibrina-plaqueta, e posteriormente pela marcação imunohistoquímica da GPIIb-IIIa plaquetária, a participação destas células na formação de trombos intravasculares, em vasos de médio e de pequeno calibre. Foram encontrados agregados plaquetários participando de diferentes padrões de trombos e interagindo com leucócitos, células endoteliais e hemácias. Em contrapartida, a depleção plaquetária não foi suficiente para inibir estes eventos trombogênicos; mesmo com a esperada ausência de agregados plaquetários, trombos apresentando intensa deposição de fibrina, além da participação de leucócitos e hemácias, obstruíram a luz de vasos de portes variados. O fato de a ausência plaquetária não ter minimizado a formação de trombos intravasculares sugere que as plaquetas não participam de forma incisiva na progressão da lesão dermonecrótica.

Por outro lado, a lesão dermonecrótica evoluiu de modo mais intenso nos animais trombocitopênicos. Desde o primeiro tempo avaliado, com 4 horas, foram constatadas áreas superficiais de equimose, fenômeno que os coelhos com contagem normal de plaqueta só vieram a apresentar após 24 horas da injeção do veneno. Por fim, a consequência final da ação dérmica do veneno pode ser constatada pela formação das escaras necróticas, que foram mais extensas e profundas nos animais depletados de plaquetas. Assim, o desenvolvimento de lesões locais mais significativas nos animais trombocitopênicos evidenciam que as plaquetas pode ser importantes para minimizar alguns fenômenos relacionados ao processo inicial de formação da lesão dermonecrótica, como por exemplo o edema e a hemorragia, os quais podem acarretar a necrose tecidual.

Histologicamente, tanto em humanos quanto em animas experimentais, são descritos nas regiões da derme expostas ao veneno loxoscélico os achados clássicos de infiltrado leucocitário, formação de trombos intra e extravasculares, hemorragia, edema e desorganização das fibras colágenas e da arquitetura dos vasos (YANNIAS & WINKELMANN, 1992; OSPEDAL et al., 2002, TAVARES et al., 2004). A ausência das plaquetas no nosso modelo experimental não minimizou a constatação destes achados, especialmente nos tempos de 4 e 24 horas, correspondentes à fase mais aguda da resposta inflamatória. Na presente análise histopatológica, a coloração de Fraser-Lendrum facilitou a

visualização de regiões com deposição de fibrina, que foram constatadas com maior intensidade nos coelhos trombocitopênicos. Esse quadro, em que se formam extensas regiões com depósito de fibrina, é denominado de necrose fibrinóide (CARLSON et al., 2005). Esse tipo de necrose é comumente relatado em patologias nas quais se constata processos de intensa vasculite, especialmente na região mais vascularizada da derme. A intensa vasculite por polimorfonucleares é um dos fenômenos centrais do quadro cutâneo do loxoscelismo e que tem sido verificada em estudos experimentais por diferentes venenos loxoscélicos (SANDERKÖETTER et al., 2001; OSPEDAL et al., 2002; TAVARES et al., 2004).

A interação das plaquetas com leucócitos nos processos de rolamento, adesão e migração tem sido mostrada em uma série de estudos experimentais (KUIJPER et al., 1996; BARRY et al., 1998; ZWAGINGA et al., 1999; RUGGERI, 2002; CARLSON et al., 2005; ISHIKAWA et al., 2005). O presente estudo histológico e imunohistoquímico da lesão dermonecrótica sugere que a vasculite resultante da ação do veneno loxoscélico, com um intenso envolvimento dos polimorfonucleares, independe da presença das plaquetas na circulação.

A maior gravidade da dermonecrose nos animais trombocitopênicos parece ser conseqüência de um processo que já se iniciou de modo mais intenso, como verificado pela formação das áreas equimóticas já no início de sua evolução, 4 horas após a injeção i.d. do veneno. Neste tempo, os animais com contagem normal de plaquetas ainda não apresentavam regiões de equimose, mas somente áreas de eritema e edema associados. Portanto, a ausência das plaquetas no nosso modelo experimental resultou na instalação de uma lesão mais expressiva desde o início do seu desenvolvimento.

Nossos resultados mostrando que os animais trombocitopênicos desenvolveram áreas mais extensas de necrose são ainda mais significativos com a confirmação, pela histologia da lesão, de que as escaras nestes animais também foram mais espessas, acometendo desta forma uma quantidade ainda maior de tecidos. A lesão dermonecrótica em humanos e em coelhos segue um padrão de progressão que sofre interferência da força da gravidade (FUTRELL, 1992; DA SILVA et al., 2004). Frequentemente, é possível se notar a ocorrência deste fenômeno, descrito como espalhamento gravitacional. GOMEZ et al (2001), estudando o veneno de *L. reclusa*, verificaram que o espalhamento da lesão

coincide com a capacidade de difusão do veneno pelos tecidos da derme. Com os dados que nós obtivemos, é possível aventar que a plaqueta ajude a conter a difusão do veneno, ao minimizar a progressão dos fenômenos hemorrágicos e da inflamação a eles associados, diminuindo desta forma o espalhamento mais intenso dos efeitos lesivos do veneno loxoscélico. Uma outra consideração a ser feita é que a membrana plaquetária pode ser uma importante fonte de substratos para o principal componente do veneno, a fração esfingomielinásica. Em plaquetas humanas, por exemplo, a esfingomielina corresponde a 24,8% do total de lipídeos da membrana (HAWIGER, 1989). Desta forma, a ausência plaquetária pode resultar em maior disponibilidade destas enzimas, que estariam livres para atuar sobre outros substratos que atuam na formação da lesão.

Recentemente, PAIXÃO-CAVALCANTI et al. (2006) mostraram que a inibição da atividade das metaloproteases (MMPs) acionadas endogenamente pela ligação da esfingomielinase D à superfície celular pode ser uma ferramenta importante para a compreensão e mesmo para o tratamento da dermonecrose no loxoscelismo. O tratamento com tetraciclina ou doxiciclina, que são moléculas capazes de quelar os íons divalentes necessários para a funcionalidade de proteínas pertencentes à família das metaloproteases, foi capaz de minimizar a ação dermonecrótica desencadeada pela esfingomielinase recombinante e também pelo veneno total de *L. intermedia*. Apesar de as plaquetas serem reservatórios celulares naturais de algumas importantes MMPs, nossos dados mostrando a exacerbação da lesão nos animais trombocitopênicos indicam que a participação das plaquetas na formação da lesão enquanto reservatório destas enzimas também não é relevante, uma vez que outras células, como fibroblastos e leucócitos, são capazes não só de estocá-las, mas também de sintetizá-las.

Por outro lado, cabe destacar a participação das plaquetas na síntese de lipoxina A4, um mediador endógeno com ação antiinflamatória gerado pela interação dos leucócitos com as plaquetas, que entre outras funções atua na resolução da resposta inflamatória (PARKINSON, 2006). Assim, a ausência da plaqueta poderia diminuir localmente a síntese da lipoxina A4, e desta forma contribuir para exacerbação da lesão observada nos animais trombocitopênicos.

Os resultados apresentados mostram pela primeira vez que o veneno loxoscélico e sua principal fração esfingomielinásica possuem uma ação *in vitro* sobre as plaquetas de

coelhos. Assim como as plaquetas humanas, a exposição ao veneno é capaz de induzir, na presença de plasma, a importantes respostas plaquetárias, como a agregação, a adesão e a ativação. Entretanto, como dito anteriormente, a ação *in vivo* deste veneno sobre a plaquetas parece ser muito mais expressiva e ampla, uma vez que vários dos efeitos lesivos do veneno sobre a célula endotelial, sobre fibroblastos e sobre queratinócitos, além de importantes substratos da matriz extracelular, podem potencializar a ativação e o envolvimento das plaquetas. Por fim, os resultados obtidos com o modelo de trombocitopenia sugerem que a participação da plaqueta na formação da lesão ocorre principalmente no sentido de minimizar alguns dos fenômenos provocados pelo veneno, como a hemorragia e o edema. A integridade e a funcionalidade normais da plaqueta podem ser importantes, no sentido de conter a expansão final da lesão.

As possibilidades de acompanhamento do quadro clínico e laboratorial dos pacientes humanos acidentados com aranhas do gênero *Loxosceles* é, de forma geral, bastante restrito, principalmente em relação às horas iniciais do envenenamento, uma vez que comumente o acidentado procura auxílio médico quando a lesão começa a se evidenciar ou quando já está instalada em sua plenitude. Assim, a compreensão dos fenômenos iniciais do processo inflamatório induzido por este veneno em modelos experimentais tem o intuito de abrir portas para terapêuticas mais eficazes para esta patologia. Os resultados experimentais aqui obtidos sugerem que seres humanos com comprometimento do número de plaquetas circulantes, e porventura com a funcionalidade plaquetária, poderiam ter um acometimento mais grave do quadro instalado pela ação local do veneno loxoscélico.

7 CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro* evidenciam que o veneno de *Loxosceles gaucho* e a sua fração esfingomielinásica são capazes de induzir os fenômenos de agregação, adesão e ativação em plaquetas de humanos e de coelhos.
- Os experimentos utilizando o modelo de trombocitopenia em coelhos evidenciou que a ausência da plaqueta resultou na formação de uma lesão dermonecrótica mais intensa, o que sugere que estas células são importantes na contenção dos fenômenos que resultam na formação da lesão.

8 REFERÊNCIAS

ANDRE, P. P-selectin in haemostasis. **Br J Haematol**, v. 126, n. 3, p. 298-306, 2004.

ANDREWS, R.K.; GARDINER, E.E.; SHEN, Y.; BERNDT, M.C. Structure-activity relationships of snake toxins targeting platelet receptors, glycoprotein Ib-IX-V and glycoprotein VI. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v. 1, n. 2, p. 143-9, 2003.

ASLAM, R.; SPECK, E.R.; KIM, M.; CROW, A.R.; BANG, K.W.; NESTEL, F.P.; NI, H.; LAZARUS, A.H.; FREEDMAN, J.; SEMPLE, J.W. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. **Blood**, v. 107, n. 2, p. 637-41, 2006.

BABCOCK, J.L.; MARMER, D.J.; STEELE, R.W. Immunotoxicology of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom. **Toxicon**, v. 24, n. 8, p. 783-90, 1986.

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 331-8, 1992.

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 113-20, 1994.

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). **J Protein Chem**, v. 15, n. 4, p. 337-43, 1996.

BARRY, O.P.; PRATICO, D.; SAVANI, R.C.; FITZGERALD, G.A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. **J Clin Invest**, v. 102, n. 1, p. 136-44, 1998.

BENNETT, J.S. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. **J Clin Invest**, v. 115, n. 12, p. 3363-9, 2005.

BERGER, R.S.; MILLIKAN, L.E.; CONWAY, F. An in vitro test for *Loxosceles reclusa* spider bites. **Toxicon**, v. 11, n. 6, p. 465-70, 1973.

BERNDT, M.C.; SHEN, Y.; DOPHEIDE, S.M.; GARDINER, E.E.; ANDREWS, R.K. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 1, p. 178-88, 2001.

BOGDAN, S.; BARABAS, J.; ZACHER, G.; HUSZAR, T.; VELICH, N.; SZABO, G.; NEMETH, Z. [Total upper lip necrosis and loxoscelism caused by violin spider bite]. **Orv Hetil**, v. 146, n. 45, p. 2317-21, 2005.

BORN, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**, v. 194, n., p. 927-9, 1962.

BOUT, D.; JOSEPH, M.; PONTET, M.; VORNG, H.; DESLEE, D.; CAPRON, A. Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. **Science**, v. 231, n. 4734, p. 153-6, 1986.

BOYUM, A. Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v. 97, n., p. 9-29, 1968.

BRADFORD, M.M.; MCRORIE, R.A.; WILLIAMS, W.L. A role for esterases in the fertilization process. **J Exp Zool**, v. 197, n. 2, p. 297-301, 1976.

BUCHERL, W. Biology and venoms of the most important South American spiders of the genera Phoneutria, Loxosceles, Lycosa, and Latrodectus. **Am Zool**, v. 9, n. 1, p. 157-9, 1969.

BURGER, P.C. ; WAGNER, D.D. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2661-6, 2003.

BURTIS, C.A. ; ASHWOOD, E.R. In: **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 2. ed., BURTIS, C.A. & ASHWOOD, E.R. (Ed.), 1986.

BYRNE, M.F.; MURPHY, J.F.; CORCORAN, P.A.; ATHERTON, J.C.; SHEEHAN, K.M.; COX, D.; MURRAY, F.E.; FITZGERALD, D.J. Helicobacter pylori induces cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in vascular endothelial cells. **Scand J Gastroenterol**, v. 38, n. 10, p. 1023-30, 2003.

CALVETE, J.J. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. **Thromb Haemost**, v. 72, n. 1, p. 1-15, 1994.

CARDOSO, J.L.; WEN, F.H.; FRANCA, F.O.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D. Detection by enzyme immunoassay of Loxosceles gaucho venom in necrotic skin lesions caused by spider bites in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 84, n. 4, p. 608-9, 1990.

CARLSON, J.A.; NG, B.T.; CHEN, K.R. Cutaneous vasculitis update: diagnostic criteria, classification, epidemiology, etiology, pathogenesis, evaluation and prognosis. **Am J Dermatopathol**, v. 27, n. 6, p. 504-28, 2005.

CHUN, J.; CONTOS, J.J.; MUNROE, D. A growing family of receptor genes for lysophosphatidic acid (LPA) and other lysophospholipids (LPs). **Cell Biochem Biophys**, v. 30, n. 2, p. 213-42, 1999.

COGNASSE, F.; HAMZEH, H.; CHAVARIN, P.; ACQUART, S.; GENIN, C.; GARRAUD, O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. **Immunol Cell Biol**, v. 83, n. 2, p. 196-8, 2005.

CORASH, L.; CHEN, H.Y.; LEVIN, J.; BAKER, G.; LU, H.; MOK, Y. Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. **Blood**, v. 70, n. 1, p. 177-85, 1987.

COUGHLIN, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1800-14, 2005.

CUNHA, R.B.; BARBARO, K.C.; MURAMATSU, D.; PORTARO, F.C.; FONTES, W.; DE SOUSA, M.V. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. **J Protein Chem**, v. 22, n. 2, p. 135-46, 2003.

CURI, T.C.; DE MELO, M.P.; PALANCH, A.C.; MIYASAKA, C.K.; CURI, R. Percentage of phagocytosis, production of O₂⁻, H₂O₂ and NO, and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. **Cell Biochem Funct**, v. 16, n. 1, p. 43-9, 1998.

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, n. 7, p. 693-709, 2004.

DA SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; DOS SANTOS, F.A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 155-61, 2003.

DA SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241-53, 2006.

DE GAETANO, G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. **Haematologica**, v. 86, n. 4, p. 349-56, 2001.

DENNY, W.F.; DILLAHA, C.J.; MORGAN, P.N. Hemotoxic effect of *Loxosceles reclusus* venom: in vivo and in vitro studies. **J Lab Clin Med**, v. 64, n., p. 291-8, 1964.

DESAI, A.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. **Inflammation**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2000.

DESAI, A.; MILLER, M.J.; GOMEZ, H.F.; WARREN, J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces NF-kappaB-dependent chemokine production by endothelial cells. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 37, n. 4, p. 447-56, 1999.

DYACHENKO, P.; ZIV, M.; ROZENMAN, D. Epidemiological and clinical manifestations of patients hospitalized with brown recluse spider bite. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 20, n. 9, p. 1121-5, 2006.

ELZEY, B.D.; TIAN, J.; JENSEN, R.J.; SWANSON, A.K.; LEES, J.R.; LENTZ, S.R.; STEIN, C.S.; NIESWANDT, B.; WANG, Y.; DAVIDSON, B.L.; RATLIFF, T.L. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 9-19, 2003.

ERIKSSON, A.C. ; WHISS, P.A. Measurement of adhesion of human platelets in plasma to protein surfaces in microplates. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 52, n. 3, p. 356-65, 2005.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.; 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**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, 1998.

FERNANDES-PEDROSA, F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, L.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R.M.; VAN DEN BERG, C.W.; RAMOS, C.R.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, n. 5, p. 638-45, 2002.

FRANCA, F.O.; BARBARO, K.C.; ABDULKADER, R.C. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 96, n. 3, p. 287-90, 2002.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, 1992.

GALVEZ, A.; BADIMON, L.; BADIMON, J.J.; FUSTER, V. Electrical aggregometry in whole blood from human, pig and rabbit. **Thromb Haemost**, v. 56, n. 2, p. 128-32, 1986.

GAWAZ, M.; FATEH-MOGHADAM, S.; PILZ, G.; GURLAND, H.J.; WERDAN, K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. **Eur J Clin Invest**, v. 25, n. 11, p. 843-51, 1995a.

_____. Severity of multiple organ failure (MOF) but not of sepsis correlates with irreversible platelet degranulation. **Infection**, v. 23, n. 1, p. 16-23, 1995b.

GINSBERG, M.H.; FRELINGER, A.L.; LAM, S.C.; FORSYTH, J.; MCMILLAN, R.; PLOW, E.F.; SHATTIL, S.J. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. **Blood**, v. 76, n. 10, p. 2017-23, 1990.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; DESAI, A.; WARREN, J.S. Loxosceles spider venom induces the production of alpha and beta chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. **Inflammation**, v. 23, n. 3, p. 207-15, 1999.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; WAGGENER, M.W.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American Loxosceles spider species. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 817-24, 2001.

GUILHERME, P.; FERNANDES, I.; BARBARO, K.C. Neutralization of dermonecrotic and lethal activities and differences among 32-35 kDa toxins of medically important Loxosceles spider venoms in Brazil revealed by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1333-42, 2001.

GUPTA, G.P. ; MASSAGUE, J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1691-3, 2004.

HANNUN, Y.A. ; LUBERTO, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. **Trends Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 73-80, 2000.

HANNUN, Y.A. ; OBEID, L.M. Ceramide and the eukaryotic stress response. **Biochem Soc Trans**, v. 25, n. 4, p. 1171-5, 1997.

HARRISON, P.; SAVIDGE, G.F.; CRAMER, E.M. The origin and physiological relevance of alpha-granule adhesive proteins. **Br J Haematol**, v. 74, n. 2, p. 125-30, 1990.

HASERUCK, N.; ERL, W.; PANDEY, D.; TIGYI, G.; OHLMANN, P.; RAVANAT, C.; GACHET, C.; SIESS, W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2585-92, 2004.

HAWIGER, J. Platelet secretory pathways: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 95, n., p. 5-21, 1989.

HILF, N.; SINGH-JASUJA, H.; SCHWARZMAIER, P.; GOUTTEFANGEAS, C.; RAMMENSEE, H.G.; SCHILD, H. Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3676-82, 2002.

HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, v. 44, n. 6, p. 608-24, 2004.

HUO, Y.; SCHOBER, A.; FORLOW, S.B.; SMITH, D.F.; HYMAN, M.C.; JUNG, S.; LITTMAN, D.R.; WEBER, C.; LEY, K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. **Nat Med**, v. 9, n. 1, p. 61-7, 2003.

ISHIKAWA, M.; VOWINKEL, T.; STOKES, K.Y.; ARUMUGAM, T.V.; YILMAZ, G.; NANDA, A.; GRANGER, D.N. CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral

microvasculature after focal ischemia/reperfusion. **Circulation**, v. 111, n. 13, p. 1690-6, 2005.

JIMENEZ, J.J.; JY, W.; MAURO, L.M.; HORSTMAN, L.L.; SODERLAND, C.; AHN, Y.S. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. **Br J Haematol**, v. 123, n. 5, p. 896-902, 2003.

JOSEPH, M.; AURIAULT, C.; CAPRON, A.; VORNG, H.; VIENS, P. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. **Nature**, v. 303, n. 5920, p. 810-2, 1983.

JURK, K. ; KEHREL, B.E. Platelets: physiology and biochemistry. **Semin Thromb Hemost**, v. 31, n. 4, p. 381-92, 2005.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; DE CASTRO, C.S.; MENDES, T.M.; GOMEZ, M.V.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1691-9, 2002.

KALVEGREN, H.; MAJEED, M.; BENGTSSON, T. Chlamydia pneumoniae binds to platelets and triggers P-selectin expression and aggregation: a causal role in cardiovascular disease? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 9, p. 1677-83, 2003.

KANEIDER, N.C.; KASER, A.; TILG, H.; RICEVUTI, G.; WIEDERMANN, C.J. CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 16, n. 3, p. 225-31, 2003.

KAPLANSKI, G.; PORAT, R.; AIURA, K.; ERBAN, J.K.; GELFAND, J.A.; DINARELLO, C.A. Activated platelets induce endothelial secretion of interleukin-8 in vitro via an interleukin-1-mediated event. **Blood**, v. 81, n. 10, p. 2492-5, 1993.

KENT, K.C.; WROBLEWSKI, L.; JACKMAN, R.W.; SKILLMAN, J.J. Platelet attachment stimulates endothelial cell regeneration after arterial injury. **Surgery**, v. 117, n. 3, p. 276-81, 1995.

KOUOH, F.; GRESSIER, B.; LUYCKX, M.; BRUNET, C.; DINE, T.; BALLESTER, L.; CAZIN, M.; CAZIN, J.C. A simple method for isolating human and rabbit polymorphonuclear neutrophils (PMNs). **Biol Pharm Bull**, v. 23, n. 11, p. 1382-3, 2000.

KUIJPER, P.H.; GALLARDO TORRES, H.I.; VAN DER LINDEN, J.A.; LAMMERS, J.W.; SIXMA, J.J.; KOENDERMAN, L.; ZWAGINGA, J.J. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. **Blood**, v. 87, n. 8, p. 3271-81, 1996.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochim Biophys Acta**, v. 678, n. 3, p. 467-76, 1981.

KUTER, D.J. ; ROSENBERG, R.D. Appearance of a megakaryocyte growth-promoting activity, megapoeitin, during acute thrombocytopenia in the rabbit. **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1464-72, 1994.

LEE, S. ; LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J**, v. 391, n. Pt 2, p. 317-23, 2005.

LEWIS, D. References ranges and normal values. **Practical Hematology**, v. 7. ed. New York: Churchill Livingstone, n., p. 9-17, 1991.

LINDEMANN, S.; TOLLEY, N.D.; DIXON, D.A.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A.; WEYRICH, A.S. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. **J Cell Biol**, v. 154, n. 3, p. 485-90, 2001.

LOPPNOW, H.; BIL, R.; HIRT, S.; SCHONBECK, U.; HERZBERG, M.; WERDAN, K.; RIETSCHEL, E.T.; BRANDT, E.; FLAD, H.D. Platelet-derived interleukin-1 induces cytokine production, but not proliferation of human vascular smooth muscle cells. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 134-41, 1998.

LUNA, M.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institutes of Pathology**. McGraw-Hill, New York, 81 p., 1968.

MAJESKI, J.A.; STINNETT, J.D.; ALEXANDER, J.W.; DURST, G.G., SR. Action of venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) on human neutrophils. **Toxicon**, v. 15, n. 5, p. 423-7, 1977.

MALAQUE, C.M.; ORI, M.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Production of TNF-alpha by primary cultures of human keratinocytes challenged with *loxosceles gaucho* venom. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 41, n. 3, p. 179-82, 1999.

MARCHESINI, N. ; HANNUN, Y.A. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. **Biochem Cell Biol**, v. 82, n. 1, p. 27-44, 2004.

MASSBERG, S.; BRAND, K.; GRUNER, S.; PAGE, S.; MULLER, E.; MULLER, I.; BERGMEIER, W.; RICHTER, T.; LORENZ, M.; KONRAD, I.; NIESWANDT, B.; GAWAZ, M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. **J Exp Med**, v. 196, n. 7, p. 887-96, 2002.

MCGREGOR, L.; MARTIN, J.; MCGREGOR, J.L. Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis. **Front Biosci**, v. 11, n., p. 830-7, 2006.

MCKINNEY, M.M. ; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **J Immunol Methods**, v. 96, n. 2, p. 271-8, 1987.

MCNICOL, A. ; ISRAELS, S.J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. **Thromb Res**, v. 95, n. 1, p. 1-18, 1999.

MEYERS, K.M.; HOLMSEN, H.; SEACHORD, C.L. Comparative study of platelet dense granule constituents. **Am J Physiol**, v. 243, n. 3, p. R454-61, 1982.

MICHELSON, A.D. ; FURMAN, M.I. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. **Curr Opin Hematol**, v. 6, n. 5, p. 342-8, 1999.

MOOLENAAR, W.H. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. **Exp Cell Res**, v. 253, n. 1, p. 230-8, 1999.

NEWLANDS, G. ; ATKINSON, P. A key for the clinical diagnosis of araneism in Africa south of the equator. **S Afr Med J**, v. 77, n. 2, p. 96-7, 1990.

OSPEDAL, K.Z.; APPEL, M.H.; FILLUS NETO, J.; MANGILI, O.C.; SANCHES VEIGA, S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Exp Pathol**, v. 83, n. 6, p. 287-94, 2002.

PACHMANN, K.; ZHAO, S.; SCHENK, T.; KANTARJIAN, H.; EL-NAGGAR, A.K.; SICILIANO, M.J.; GUO, J.Q.; ARLINGHAUS, R.B.; ANDREEFF, M. Expression of bcr-abl mRNA in individual chronic myelogenous leukaemia cells as determined by in situ amplification. **Br J Haematol**, v. 112, n. 3, p. 749-59, 2001.

PAIXAO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C.W.; DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M.; GONCALVES DE ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by loxosceles venom sphingomyelinase D. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 1, p. 61-8, 2006.

PAMPOLINA, C. ; MCNICOL, A. Streptococcus sanguis-induced platelet activation involves two waves of tyrosine phosphorylation mediated by FcγRIIA and αIIbβ3. **Thromb Haemost**, v. 93, n. 5, p. 932-9, 2005.

PANCRE, V.; MONTE, D.; DELANOYE, A.; CAPRON, A.; AURIAULT, C. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *Schistosoma mansoni*. **Eur Cytokine Netw**, v. 1, n. 1, p. 15-9, 1990.

PARKINSON, J.F. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 5, n. 2, p. 91-106, 2006.

PATEL, K.D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M.; MCINTYRE, 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. **J Clin Invest**, v. 94, n. 2, p. 631-42, 1994.

PENA, L.A.; FUKS, Z.; KOLESNICK, R. Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. **Biochem Pharmacol**, v. 53, n. 5, p. 615-21, 1997.

RAND, M.L.; PACKHAM, M.A.; TAYLOR, D.M.; YEO, E.L.; GEMMELL, C.H.; PATIL, S.; LAM, S.C. The fibrinogen gamma chain dodecapeptide inhibits agonist-induced aggregation of rabbit platelets and fibrinogen binding to rabbit glycoprotein IIb-IIIa. **Thromb Haemost**, v. 82, n. 6, p. 1680-6, 1999.

REED, G.L.; HOUNG, A.K.; BIANCHI, C. Comparative biochemical and ultrastructural studies of P-selectin in rabbit platelets. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 119, n. 4, p. 729-38, 1998.

REES, R.S.; GATES, C.; TIMMONS, S.; DES PREZ, R.M.; KING, L.E., JR. Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 26, n. 11, p. 1035-45, 1988.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T.; PIESCO, R.V.; NISHIOKA SDE, A. Wolf spider bites in Sao Paulo, Brazil: a clinical and epidemiological study of 515 cases. **Toxicon**, v. 28, n. 6, p. 715-7, 1990.

ROTHER, E.; BRANDL, R.; BAKER, D.L.; GOYAL, P.; GEBHARD, H.; TIGYI, G.; SIESS, W. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. **Circulation**, v. 108, n. 6, p. 741-7, 2003.

RUGGERI, Z.M. Platelets in atherothrombosis. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1227-34, 2002.

SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C.; FLORES DA ROCHA, T.R.; SOARES TORQUATO, R.J.; HIRATA, I.Y.; SANO-MARTINS, I.S. Simultaneous isolation of platelet factor 4 and glycoprotein IIb-IIIa complex from rabbit platelets, and characterization of specific chicken antibodies to assay them. **J Immunol Methods**, v. 284, n. 1-2, p. 55-72, 2004.

SANTORO, M.L. ; SANO-MARTINS, I.S. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. **Thromb Haemost**, v. 92, n. 2, p. 369-83, 2004.

SAÚDE, M.D. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Brasília, Fundação Nacional da Saúde.**, v., n., p., 2001.

SAVAGE, B.; CATTANEO, M.; RUGGERI, Z.M. Mechanisms of platelet aggregation. **Curr Opin Hematol**, v. 8, n. 5, p. 270-6, 2001.

SCHENONE, H. [Toxic pictures produced spiders bites in Chile: latrosectism and loxoscelism]. **Rev Med Chil**, v. 131, n. 4, p. 437-44, 2003.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. [Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 6, p. 403-15, 1989.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONCALVES JUNIOR, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; CARDOSO, J.L.; VON EICKSTEDT, V.R.; FRANCA, F.O.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n. 5, p. 546-8, 1998.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SPIEGEL, S.; FOSTER, D.; KOLESNICK, R. Signal transduction through lipid second messengers. **Curr Opin Cell Biol**, v. 8, n. 2, p. 159-67, 1996.

STEINHUBL, S.R. Platelets as mediators of inflammation. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 21, n. 1, p. 115-21, 2007.

STEINHUBL, S.R. ; MOLITERNO, D.J. The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. **Am J Cardiovasc Drugs**, v. 5, n. 6, p. 399-408, 2005.

SUNDERKOTTER, C.; SEELIGER, S.; SCHONLAU, F.; ROTH, J.; HALLMANN, R.; LUGER, T.A.; SORG, C.; KOLDE, G. Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. **Exp Dermatol**, v. 10, n. 6, p. 391-404, 2001.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VON EICKSTEDT, V.R.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; DA SILVA, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J Immunol**, v. 155, n. 9, p. 4459-66, 1995.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 683-91, 2000.

TAVARES, F.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C.; REBECCHI, I.M.; SANO-MARTINS, I.S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Hum Exp Toxicol**, v. 23, n. 10, p. 477-86, 2004.

TOMER, A. Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 18, n. 2, p. 172-7, 2004.

VAN DEN BERG, C.W.; DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; MARCHBANK, K.J.; TAMBOURGI, D.V. Loxosceles spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/CD46 and MHCI and induces protection against C-mediated lysis. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 102-10, 2002.

VAN MEETEREN, L.A.; FREDERIKS, F.; GIEPMANS, B.N.; PEDROSA, M.F.; BILLINGTON, S.J.; JOST, B.H.; TAMBOURGI, D.V.; MOOLENAAR, W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **J Biol Chem**, v. 279, n. 12, p. 10833-6, 2004.

VAN MEETEREN, L.A.; STORTELERS, C.; MOOLENAAR, W.H. Upregulation of cytokine expression in fibroblasts exposed to loxosceles sphingomyelinase D: what is the trigger? **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 5, p. 1266-7; author reply 1267-8, 2007.

VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUS, 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, n. 6, p. 825-39, 2000.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; DOS SANTOS, V.L.; 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**, v. 37, n. 4, p. 587-607, 1999.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M.A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res**, v. 102, n. 3, p. 229-37, 2001.

WATSON, S.P.; AUGER, J.M.; MCCARTY, O.J.; PEARCE, A.C. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1752-62, 2005.

WEYRICH, A.S.; LINDEMANN, S.; ZIMMERMAN, G.A. The evolving role of platelets in inflammation. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 9, p. 1897-905, 2003.

WOJCIK, J.D.; VAN HORN, D.L.; WEBBER, A.J.; JOHNSON, S.A. Mechanism whereby platelets support the endothelium. **Transfusion**, v. 9, n. 6, p. 324-35, 1969.

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

YOUSSEFIAN, T.; DROUIN, A.; MASSE, J.M.; GUICHARD, J.; CRAMER, E.M. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 4021-9, 2002.

ZWAAL, R.F.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E.M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 9, p. 971-88, 2005.

ZWAGINGA, J.J.; TORRES, H.I.; LAMMERS, J.; SIXMA, J.J.; KOENDERMAN, L.; KUIJPER, P.H. Minimal platelet deposition and activation in models of injured vessel wall ensure optimal neutrophil adhesion under flow conditions. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, n. 6, p. 1549-54, 1999.