

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA - CEA - USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO DO PROJETO: "Estudo dos mecanismos envolvidos na gênese da lesão dermonecrótica experimentalmente provocada pelo veneno da aranha marrom".

PESQUISADORA: Danielle Paixão Cavalcante

ORIENTADORA: Denise Vilarinho Tambourgi

INSTITUIÇÃO: Instituto de Ciências Biomédicas - USP

FINALIDADE: Mestrado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Danielle Paixão Cavalcante
Denise Vilarinho Tambourgi
Carmen Diva Saldiva de André
Rinaldo Artes
Cátia Petri
Eduardo de Arruda Issei
Frederico Zanqueta Poleto
Marco Antônio Vincenzi
Simone Curti

DATA: 04/06/2002

FINALIDADE DA CONSULTA: Assessoria no dimensionamento amostral e análise estatística.

RELATÓRIO ELABORADO POR: Cátia Petri
Eduardo de Arruda Issei

1. Introdução

As aranhas marrons, pertencentes à espécie *Loxosceles intermedia*, encontradas no sul e sudeste do Brasil, estão entre as mais venenosas do país. Com tamanho aproximado de 1cm, facilmente escondem-se em armários, entre roupas e dentro de outros móveis da casa. Sua picada é indolor e os efeitos do veneno só são sentidos de oito a dezoito horas depois, quando já é muito difícil reverter o quadro de reações que o corpo sofre.

Nos casos menos graves, a pessoa atacada terá apenas uma vermelhidão intensa no local da picada. Geralmente ocorre uma lesão dermonecrótica, que pode ser descrita como uma reação na pele que a deixa preta e necrosada. Essas reações locais são menos nocivas que as sistêmicas, que comprometem todo o corpo. Nesses casos, pode haver hemólise intravascular, o que significa o rompimento das hemácias do sangue, deixando a urina vermelha e o sangue diluído. Como o sistema renal também pode ser comprometido, não são raros os óbitos.

Segundo o Instituto Butantan, a importância do estudo do veneno não se restringe apenas à busca por soros eficientes, mas serve também para entender melhor os sistemas imunológicos e como funciona a coagulação no ser humano (http://www.lsi.usp.br/~aun/arquivo/33_200/ano33-19.htm).

2. Descrição do estudo

O estudo foi dividido em dois ensaios, *in vivo* e *in vitro*, que serão descritos a seguir.

2.1 Ensaio *in vivo*

Para este estudo foram utilizados coelhos devido à similaridade de suas células cutâneas com as do ser humano.

Três compostos foram inoculados nos coelhos ao mesmo tempo, em regiões do dorso distantes entre si. Foi garantido que a aplicação destes compostos em um

mesmo animal não influencia os resultados obtidos nas diferentes regiões. Os compostos são os seguintes:

- a) Salina (0,85% de NaCl);
- b) Soro ou inibidor de protease, que pode ser:
 - EDTA: inibidor de Metaloproteinase;
 - 1,10 fenatrolina: inibidor de Metaloproteinase;
 - PMSF: inibidor de Serinoprotease;
 - Soro anti-aracnídico: soro anti-veneno;
 - Soro anti-P3: soro anti-veneno. P3 é uma fração do veneno de *L. intermedia* que não possui atividade dermonecrótica.
- c) Veneno de *L. intermedia*, tratado com um dos soros ou inibidores citados acima.

Assim, de acordo com os três compostos administrados, os seguintes grupos, com dois animais em cada um, foram formados:

- **Controle** (compostos: salina + salina + salina);
- **Veneno** (compostos: veneno de *L. intermedia* + salina + salina);
- **Veneno + inibidor 1** (compostos: veneno de *L. intermedia* + EDTA + salina);
- **Veneno + inibidor 2** (compostos: veneno de *L. intermedia* + 1,10 fenatrolina + salina);
- **Veneno + inibidor 3** (compostos: veneno de *L. intermedia* + PMSF + salina);
- **Veneno + soro 1** (compostos: veneno de *L. intermedia* + Soro anti-aracnídico + salina);
- **Veneno + soro 2** (compostos: Veneno de *L. intermedia* + Soro anti-P3 + salina).

Após 24 horas, os animais foram sacrificados e fragmentos de pele, do local da inoculação, foram coletados, lavados rapidamente em solução salina e processados. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica e fotografadas.

2.2 Ensaio *in vitro*

Para este ensaio foram utilizados os tipos celulares mais importantes tanto da pele humana (3 tipos) como da de coelho (1 tipo).

Em cada tipo celular foram aplicadas uma solução controle (meio de cultura) e uma com agentes (veneno diluído em meio de cultura). Três tipos de tratamentos (ensaios) foram aplicados a estas células:

- **Ensaio de viabilidade celular**

Células em suspensão foram distribuídas em três placas de cultura. O veneno de *L. intermedia* (aplicado nas doses: 0,3 µg/mL, 1,0 µg/mL, ou 3,0 µg/mL) e outros reagentes nocivos (5,0 µM de C2-ceramida ou 10,0 ng/mL de TNF-α), testados em paralelo, foram aplicados na placa de cultura. Cada placa foi avaliada após períodos de tempo diferentes:

- placa 1 - após um dia de tratamento;
- placa 2 - após dois dias de tratamento;
- placa 3 - após três dias de tratamento.

Após o período de tratamento, os sobrenadantes das culturas foram descartados e as células foram incubadas com um reagente colorimétrico que mede a capacidade das células vivas converterem o corante de roxo para rosa. Esta alteração de cor é medida utilizando um espectrofotômetro que emite um feixe de luz e, de acordo com a refração do feixe, identifica a cor presente e a transforma em um valor numérico (viabilidade celular).

- **Citometria de fluxo - Análise da expressão dos marcadores de superfície**

As células também estavam em suspensão. Na superfície celular existem diferentes tipos de moléculas que podem ser reconhecidas por anticorpos. Estes anticorpos são marcados com substâncias fluorescentes.

O veneno pode interferir na expressão das moléculas superficiais das células, aumentando ou diminuindo o número de moléculas. Após o tratamento com o veneno,

as células foram incubadas com os anticorpos marcados. A intensidade de fluorescência, ou seja, o número de anticorpos que se ligaram à célula, foi avaliada em 5 mil células tratadas ou não (controle negativo) através de citômetro de fluxo (leitor de fluorescência).

- **Citometria de fluxo - Ligação de Anexina V**

Novamente as células estavam em suspensão. Células que entram num processo de morte, denominado apoptose, passam a expressar uma molécula denominada fosfatidilserina, que tem alta afinidade de ligação pelas moléculas Anexina, que são usadas como marcador. Neste tratamento (ensaio) foi contado quantas células carregam a Anexina na superfície e não o número de moléculas de Anexina que se ligaram à célula (como no tratamento anterior). Foram contadas 5 mil células utilizando o citômetro de fluxo.

3. Descrição das variáveis

3.1 Ensaio *in vivo*

Na presença de lesão, observa-se:

- Presença de células do infiltrado inflamatório (quantidade e localização);
- Presença de hemorragia (quantidade e localização);
- Alteração da organização e integridade das fibras colágenas;
- Edema.

3.1 Ensaio *in vitro*

As variáveis medidas neste estudo foram as seguintes:

- Tempo após o tratamento: 1, 2 ou 3 dias;

- Dose de substância:
 - 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*;
 - 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*;
 - 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*;
 - 5,0 μM de C2-ceramida;
 - 10,0 ng/mL de $\text{TNF-}\alpha$.
- Viabilidade celular, medida em porcentagem;
- Número de anticorpos que se ligaram às células;
- Porcentagem de células Anexina positiva.

4. Situação do projeto

Os dois ensaios já foram realizados e a pesquisadora dispõe de lâminas com os tecidos celulares, a partir das quais algumas variáveis serão medidas.

5. Sugestões do CEA

5.1 Planejamento Amostral (Ensaio *in vivo*)

A partir das lâminas com tecido celular, para quantificar o número de células que migram da circulação para a área da lesão, foram sugeridos os seguintes procedimentos:

- Medir a “área” das lesões dentro da lâmina;
- Fazer um reticulado e sortear campos para contar o número de células migrantes por retículo, uma vez que é inviável a realização da contagem em toda a lâmina. Como as lâminas apresentam uma configuração heterogênea, a área da lâmina pode ser dividida em sub-regiões homogêneas e um sorteio dos reticulados pode ser feito em cada sub-região.
- Levar as lâminas com as amostras para um biólogo familiarizado com contagem de células para obter sugestões de métodos utilizados na contagem de células em situações semelhantes a do projeto.

5.2 Modelagem (Ensaio *in vitro*)

No tratamento “Ensaio da viabilidade celular” , para analisar se a viabilidade celular é diferente para cada tratamento, em relação ao controle, sugere-se uma Análise de Variância [Neter et al, 1996], com uma medida por casela e 2 fatores fixos, onde:

Variável resposta: média amostral das viabilidades da triplicata;

Fator A: Tempo após o tratamento, com três níveis:

- placa 1 - após um dia de tratamento;
- placa 2 - após dois dias de tratamento;
- placa 3 - após três dias de tratamento.

Fator B: Dose de substância, com cinco níveis:

- 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*;
- 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L. intermedia*;
- 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L.intermedia*;
- 5,0 μM de C2-ceramida;
- 10,0 ng/mL de TNF- α .

No tratamento “Citometria de fluxo – Ligação de Anexina V”, para avaliar se há efeito de dose (1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de veneno de *L.intermedia*) sobre a porcentagem de células Anexina positivas ao longo do tempo de tratamento, sugere-se uma regressão logística ou um modelo log-linear [Agresti, 1990], onde:

Variável resposta: probabilidade de ocorrência de células Anexina positivas;

Fator A: Tempo após o tratamento, com três níveis:

- placa 1 - após um dia de tratamento;
- placa 2 - após dois dias de tratamento;
- placa 3 - após três dias de tratamento.

Fator B: Dose de substância, com cinco níveis:

- 0,3 µg/mL de veneno de *L. intermedia*;
- 1,0 µg/mL de veneno de *L. intermedia*;
- 3,0 µg/mL de veneno de *L. intermedia*;
- 5,0 µM de C2-ceramida;
- 10,0 ng/mL de TNF- α .

6. Conclusão

Sugere-se à pesquisadora que encaminhe o estudo ao CEA-IME para uma triagem, até o fim de junho de 2002, para que o mesmo seja um projeto a ser analisado ao longo do segundo semestre deste ano.

Referências bibliográficas:

AGRESTI, A. (1990). **Categorical Data Analysis**. 1st ed. John Wiley & Sons. 558p.

NETER, J., KUTNER, M. H., NACHTSHEIN, C. J. e WASSERMAN, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. 4th ed. McGraw-Hill. 1408p.