

**Avaliação Morfológica e Evolutiva de Lesões Cutâneas
Induzidas Experimentalmente pelo Veneno da Serpente
*Bothrops jararaca***

LUCIANA FERREIRA DE ARAÚJO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Dermatologia).

Orientadores: Prof. Dr. Juan Manuel Piñeiro Maceira
Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Rio de Janeiro
fevereiro/2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Avaliação Morfológica e Evolutiva de Lesões Cutâneas
Induzidas Experimentalmente pelo Veneno da Serpente
*Bothrops jararaca***

Luciana Ferreira de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Juan Manuel Piñeiro Maceira
Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina (Dermatologia), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Dermatologia).

Aprovada por:

Presidente, Prof^a. Dr^a.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Rio de Janeiro
fevereiro/2005

Araujo, Luciana Ferreira

Avaliação morfológica e evolutiva de lesões cutâneas induzidas experimentalmente pelo veneno de *Bothrops jararaca* / Luciana Ferreira de Araujo. – Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2005.

xviii, 93 f. : il.

Orientador: Juan Manuel Piñeiro Maceira

Paulo de Assis Melo

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / Faculdade de Medicina / Dermatologia, 2005.

1. BOTHROPS 2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS 3. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA 5. VENENOS DE CROTALÍDEOS- Tese. I. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina. II. Título.

Aos meus pais, Cezar e Sueli, pelo carinho, apoio e compreensão incondicionais. Por permitirem que eu realizasse os meus sonhos.

Ao meu esposo Érisson, amigo de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Professor Doutor Paulo de Assis Melo, por todos os ensinamentos, ajuda na escolha da dissertação e por sua persistência e dedicação, motivando-me em todos os momentos.

Ao Professor Doutor Juan Manuel Piñeiro Maceira pela orientação, incansáveis revisões da dissertação e enorme ajuda na escolha do tema.

À Professora Sueli Coelho Carneiro, pelas inesgotáveis paciência e carinho ao realizar imprescindíveis observações e sugestões para a dissertação.

À Pós-graduação em Dermatologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que na pessoa do Professor Absalom Lima prestou fundamental apoio à realização deste trabalho.

À Comissão Científica do 57^o Congresso Brasileiro de Dermatologia, realizado em Porto Alegre- RS, pelo prêmio Professor Clovis Bopp, 1^o lugar, na categoria de melhor trabalho de investigação, apresentação oral, concedido em setembro de 2002.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Basílio de Oliveira pela colaboração na confecção das lâminas, tendo em vista que as mesmas foram feitas em seu Serviço de Anatomia Patológica, na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro- Uni-Rio.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Dra. Eliane Francine Simon, grande amiga, por estar sempre ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

À prima e amiga Patrícia Lanzelotti Dantas, pela correção do texto.

À amiga Dra. Mirela Rocha Azamôr pela ajuda e sugestões que possibilitaram a execução do trabalho.

À amiga Dra. Flávia Haikal Tanus Hermolin que se colocou ao meu lado incondicionalmente durante todo o curso.

Aos técnicos Jorge Carneiro e Elizabeth Jovette D'Ávila, pela realização dos cortes tissulares e técnica imuno-histoquímica.

RESUMO

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E EVOLUTIVA DE LESÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE PELO VENENO DA SERPENTE *BOTHROPS JARARACA*

O exato mecanismo para o desenvolvimento dos tumores malignos tem sido matéria de estudo e especulação. Para tanto, os modelos animais vêm se mostrando eficazes na elucidação dos eventos moleculares responsáveis pelos vários estágios da tumorigênese. Um dos primeiros relatos, foi feito no ano 2000, pela equipe de Mello, radiologista do Instituto Nacional do Cancer (INCA) sobre acidente ofídico com serpente do gênero *Bothrops*, que após completa recuperação da lesão ulcerada permaneceu com área descamativa, assintomática, de cerca de 5 mm. Após 23 anos, surgiu na mesma área carcinoma espinocelular bem diferenciado. No Brasil são relatados, anualmente, pelo Ministério da Saúde, cerca de 20.000 casos de acidentes ofídicos, sendo 90,4% causados por serpentes do gênero *Bothrops*. Os autores se propõem a avaliar experimentalmente, com análise histopatológica e imuno-histoquímica, as alterações induzidas pelo veneno de serpentes na pele de camundongos, nos diferentes estágios pós-empeçonhamento, tomando-se como referência o veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca*. Embora os venenos de serpente não pareçam estar envolvidos na produção de neoplasia, experimentalmente a toxina ofídica induziu hiperplasia e alterações citológicas displásicas na epiderme dos roedores. Na derme sobressaíram-se a proliferação vascular e fibroblástica. Em nosso trabalho destacamos o efeito angiogênico e apresentamos um modelo experimental de inflamação e reparo.

Descritores: *BOTHROPS*, CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS, CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS, IMUNO-HISTOQUÍMICA, VENENOS DE CROTALÍDEOS.

Rio de Janeiro

fevereiro/2005

SUMMARY

MORPHOLOGICAL AND EVOLUTIONAL EVALUATION OF EXPERIMENTALLY INDUCED CUTANEOUS LESIONS BY VENOM FROM THE SNAKE *BOTHRUPS JARARACA*

The precise mechanism for development of malignant tumors has been object of studies and speculation. For this aim, animal models have been showing efficacy in the clarification of molecular events responsible for the several stages of tumorigenesis. Mello and colleagues, 2000, reported a case of an ophidic accident with a snake of the genus *Bothrops*, where after complete recovery of the ulcerated lesion, a desquamative non-symptomatic area of approximately 5 mm persisted. After elapse of 23 years, it evolved into a well-differentiated spinocellular carcinoma. The Health Ministry in Brazil reports about 20,000 cases of ophidic accidents yearly, with 90.4% caused by snakes of the *Bothrops* genus. The authors propose to evaluate the alterations from snake venom in mice skin experimentally, with histopathological and immunohistochemical analyses, in the different post-inoculation stages, taking as reference the crude venom of *Bothrops jararaca*. Although snake venoms do not seem to be involved in the production of neoplasia, experimentally the ophidic toxin induced hyperplasia and dysplasic cytological alterations in the epidermis of the rodents. In the dermis, vascular and fibroblast proliferation were noticeable. In our study we highlight the angiogenic effect and present an experimental model of inflammation and repair.

Keywords: *BOTHRUPS*, CARCINOMA, SQUAMUS CELL, WOUND HEALING, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, CROTALID VENOMS.

Rio de Janeiro,

February/2005

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	LESÃO CELULAR POR PEÇONHAS OFÍDICAS	3
2.2	QUIMIOCARCINOGENESE E MODELOS EXPERIMENTAIS	13
2.3	LESÕES EPITELIAIS PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS	23
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	35
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	MATERIAL	36
5.2	MÉTODOS- INDUÇÃO DA LESÃO.....	36
5.3	IMUNO-HISTOQUÍMICA	37
5.4	ANTICORPOS EMPREGADOS	38
5.5	CONTROLES	38
6	RESULTADOS	40
6.1	ANÁLISE CLÍNICO-PATOLÓGICA	40
6.2	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	43
7	DOCUMENTAÇÃO FOTOMICROGRÁFICA	55

8	DISCUSSÃO	67
9	CONCLUSÕES	76
10	PERSPECTIVAS.....	77
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (albumina sérica bovina)
CAUAP	Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa
CE	Carcinoma espinocelular
CK	Citoqueratina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Fig	Figura
HE	Hematoxilina-eosina
KD	Kilodáton
MN	Mononucleares
P53	<i>Phosphoprotein 53 KD</i> (fosfoproteína 53 KD)
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (solução salina de tampão fosfato)
PMN	Polimorfonucleares
PUVA	Psoraleno e exposição a ultravioleta A
RAS	<i>Reticular activating sistem</i> (sistema reticular ativador)
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)

GLOSSÁRIO*

Alcatrão- mistura de diversos componentes, líquida, negra, obtida da destilação de substâncias orgânicas, como petróleo, madeira ou carvão.

Aneuploidia- que tem o número anormal de cromossomas e não o múltiplo exato do número haplóide. Tipo de mosaicismo em que algumas células têm um número anormal de cromossomas e outras, um número normal.

Anticorpo - proteína imune ou protetora; originalmente, substância estimulante no homem ou outro animal por um antígeno. Agora supõe-se que os anticorpos também possam existir naturalmente sem estarem presentes como consequência de estímulo fornecido pela introdução de um antígeno. Uma das classes de imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo ou nos líquidos corporais de um animal como resultado de estímulo antigênico ou de ocorrência “natural”.

Anti-soro - imunossoro, soro que contém anticorpo demonstrável ou anticorpos específicos para um ou mais antígenos.

Apoptose- tipo de necrose na qual a célula se fragmenta com fagocitose subsequente dos fragmentos celulares. O processo pode ocorrer em uma ampla variedade de tecidos e tipos celulares e é visto em queratinócitos, podendo ser encontrada em condições fisiológicas e/ou patológicas.

Autacóides- grupamento de substâncias que participam das respostas fisiológicas à lesão. Histamina, bradicinina, s-hidroxitriptamina.

Avidina - uma proteína da clara do ovo que se liga à biotina tornando-se indisponível para absorção. Tem sido usada em ensaios bioquímicos.

Benzidina - usado para detectar sulfatos na análise de água ou para a identificação do sangue.

Bradicinina- uma das inúmeras cininas plasmáticas, vasodilatador potente e mediador fisiológico da anafilaxia, liberada de mastócitos, após reação de antígeno-anticorpo.

Catalisar- acelerar uma reação química.

*Fonte: Stedman Dicionário Médico- 25ª Edição, 1996.

Célula de Merkel- célula da camada basal, contendo substâncias neurotransmissoras. Origem discutida como neural por associar-se a terminações nervosas mielinizadas e possíveis funções táteis. Outros a consideram queratinócito modificado.

Ciclo celular- acontecimentos bioquímicos e estruturais cíclicos que ocorrem durante o crescimento rápido de células tais como em cultura de tecidos; o ciclo é dividido em períodos denominados: Go; hiato (G1); síntese (S1); hiato 2 (G2) e mitose (M).

Cisteína- aminoácido encontrado na maioria das proteínas, especialmente abundante na ceratina.

Citoqueratinas - são as proteínas estruturais mais importantes das células epiteliais, e exibem a maior heterogeneidade dentre as proteínas do filamento intermediário.

Clonal- quando usado no texto, faz referência a um padrão caracterizado pela presença de ninhos celulares que proliferam.

Clone- colônia ou grupo de organismos que se origina de uma única célula ou organismo.

C-myc- oncoproteína envolvida na regulação do ciclo celular e no controle do crescimento. Sua expressão na camada suprabasal de camundongos transgênicos induz à hiperproliferação e alteações neoplásicas.

Cromatina - material genético do núcleo, consistindo em desoxirribonucleoproteína, que ocorre sob duas formas durante a fase entre as divisões mitóticas: heterocromatina e eucromatina. Durante a divisão mitótica, a cromatina se condensa e é vista como cromossoma.

Cromogranina A - proteína solúvel de grânulos cromafins. Uma proteína acídica.

Cromossoma- um dos corpúsculos (46 no homem) no núcleo celular que é portador de genes.

Degeneração - deterioração; modificação patológica regressiva em células ou tecidos; em algumas fases, o processo degenerativo é reversível, mas habitualmente surge necrose.

DNA- *deoxyribonucleic acid*. Encontrado no núcleo das células animais e vegetais, considerado o componente auto-reprodutor de cromossomas e o depositário das características hereditárias.

Dendrócito dérmico- formas precursoras de células de Langerhans (dotadas da capacidade de apresentar antígenos) que modificam seu fenótipo antes ou após contatar a epiderme.

Descarboxilação - reação que envolve a remoção de uma molécula de dióxido de carbono de um ácido carboxílico.

Desmina - alfa-aminoácidos, em geral lisina e norleucina, condensados mais através de suas cadeias laterais do que de seus grupos alfa-amino e carboxila; co-polimeriza com vimentina para formar constituintes de tecido conjuntivo, paredes celulares, filamentos etc.

Diferenciação- ato ou processo de aquisição completa das características individuais, como ocorre na diversificação progressiva das células e tecidos do embrião.

EDTA- agente quelante, remove cálcio ou metais pesados.

Epigenético- Regulação da expressão da atividade do gene sem alteração da estrutura genética.

Epítipo- determinante antigênico

Expressão- revelação de um determinado atributo antigênico através das técnicas imuno-histoquímicas.

Fenotípico- manifestação de um genótipo ou de diversos genótipos diferentes.

Filamentos de ancoragem- elementos fibrilares que se inserem na lâmina densa, a partir da lâmina basal, atravessando o espaço lúcido- ultra-estrutura da junção dermo-epidérmica.

Filamentos intermediários - uma classe de filamentos citoplasmáticos de 8-10nm em diâmetro que age preferencialmente como componentes estruturais do citoesqueleto e também efetua vários movimentos nos processos celulares. As proteínas que formam os diferentes filamentos são diversas e tecido-específicas.

Fosfolipase A₂- enzima que catalisa a hidrólise de um fosfolípido.

Genótipo- constituição genética de um indivíduo, combinação de genes em um locus especificado.

Glicoproteína - um dos compostos de um grupo de proteína carboidrato (proteínas conjugadas), entre as quais os mais importantes são as mucinas mucóides e amilóides.

Hematoxilina - um composto cristalino amarelo-escuro ou laranja, contendo a substância corante *Haematoxilon campechianum* (pau-campeche), do qual é obtida por extração com éter. É utilizada como corante em histologia, especialmente para núcleos celulares e cromossomas, estrias musculares cruzadas e células enterocromafins.

Hemidesmossoma- meios desmossomas que ocorrem na superfície basal do estrato basal do epitélio escamoso estratificado.

Hiperplasia - aumento do número de células em um tecido ou órgão, excluindo a formação tumoral, pela qual a massa do órgão pode estar aumentada.

◆Hiperplasia pseudoepiteliomatosa/pseudocarcinomatosa - aumento benigno nas células epidérmicas; microscopicamente assemelha-se ao carcinoma de células escamosas.

Imunofenotipagem- identificação de um fenótipo ou manifestação de um genótipo pela imunorreação.

Imunofluorescência- marcação de anticorpos pela fluoresceína para identificar antígeno específico para o anticorpo marcado. A união antígeno-anticorpo pode ser determinada microscopicamente pela produção de uma característica luz. Na técnica indireta utiliza-se o soro do paciente incubado com substrato contendo antígenos epiteliais (esôfago de macaco, prepúcio humano).

Imuno-histoquímica - demonstração de antígenos específicos em tecidos pelo uso de marcadores que são corantes fluorescentes ou enzimas, especialmente a peroxidase.

Integrina- família de receptores expressa na superfície celular. Atuam como receptores para as moléculas da matriz extracelular e para moléculas na superfície de outras células, sendo necessárias para a interação célula-célula, célula-interstício.

Laminina- componente protéico polipeptídico da membrana basal.

Ligante- uma molécula que se liga a outra; usado especialmente para se referir a uma pequena molécula que se liga especificamente a outra maior; um antígeno que se prende a um receptor ou substrato, ou efetor alostérico que se liga a uma enzima.

Lisossoma - vesícula ligada à membrana citoplasmática, que mede de cinco a oito nanômetros e contém uma ampla variedade de enzimas hidrolíticas glicoprotéicas ativas em pH ácido; serve para digerir material exógeno, como as bactérias, bem como enfraquecer organelas das células.

Lisozima - Muramidase, enzima que hidrolisa as ligações entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina, sendo assim destrutiva para as paredes celulares de certas bactérias.

Metabólito - qualquer produto (alimentar, intermediário, residual) do metabolismo, especialmente do catabolismo.

Mielóide - pertinente a, derivado de, ou que manifesta certos aspectos da medula óssea. Pertinente a certas características de formas mielocíticas, mas não significando necessariamente, origem na medula óssea.

Mitógeno- substância que estimula a mitose (formação de células filhas com exatamente o mesmo teor de cromossomas e DNA que a célula original).

Monoclonal- em imunquímica, pertinente a uma proteína de um único clone de células, das quais todas as moléculas são as mesmas.

Mutação- mudança do gene que é perpetuada em divisões subseqüentes da célula; mudança na seqüência de pares básicos na molécula cromossômica.

Mutante- fenótipo em que se manifesta uma mutação

Necrose - morte patológica de uma ou mais células ou de uma porção de tecido ou órgãos, resultante de alterações irreversíveis.

Neoplasia - processo patológico que leva à formação de tecido anormal que cresce por proliferação celular mais rapidamente que o normal. Apresenta uma falta parcial ou completa de organização estrutural. Em geral forma uma massa distinta do tecido que pode ser benigno (tumor benigno) ou maligno (câncer).

Oncogene- gene transformador; gene viral, encontrado em determinados retrovírus, que podem transformar a célula hospedeira em um fenótipo neoplásico, mas que não é necessário para a replicação viral.

p53- fosfoproteína 53 KD. Gene supressor tumoral de onde o produto genético regula o ciclo de crescimento e proliferação celular. Mutações no p53 são as alterações genéticas mais comuns no câncer humano.

Parácrino- liberação de substâncias de ação local pelas células endócrinas diretamente no espaço intercelular das células adjacentes.

Peroxidase - um termo usado para designar as enzimas pertencentes à classe da oxidoredutase, que catalisam a oxidação de substratos orgânicos pelo peróxido de hidrogênio, o qual é reduzido a água.

Pleomórfico - ocorrência de mais de uma forma, mais de um tipo morfológico.

Polipeptídeo - peptídeo formado pela união de um número indefinido de aminoácidos por ligações peptídicas.

Protoncogene- gene preexistente, presente no genoma normal, que parece ter um papel na fisiologia celular normal e é, com freqüência, envolvido na regulação do crescimento ou proliferação celular normal; o comprometimento desses genes em um processo neoplásico é conseqüência de mutações somáticas que o convertem em alelos oncogênicos.

Receptor- molécula protéica estrutural na superfície celular ou no interior do citoplasma que se liga a um fator específico.

Remodelamento tissular- um dos processos da cicatrização de feridas.

Sistema Fagocítico-Mononuclear - sistema de macrófagos; coleção amplamente distribuída de macrófagos livres e fixos derivados de células precursoras da medula óssea, através de monócitos. Tanto no tecido conjuntivo, quanto no linfóide, podem ocorrer sob a forma de macrófagos livres e fixos; nos sinusóides hepáticos, como células de Kupffer; no pulmão, como macrófagos alveolares; e no sistema nervoso central, como micróglia.

Substrato- reagente considerado atacado em uma reação química.

Ultraestrutural - estruturas ou partículas observadas com o ultramicroscópio ou microscópio eletrônico.

Xenobiótico- substância farmacológica, endócrina ou toxicologicamente ativa, não produzida endogenamente e, portanto, estranha ao organismo.

Zimogêneos- pró- enzimas. O precursor de uma enzima que exige alguma alteração a fim de torná-lo ativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos monoclonais empregados.....	39
Tabela 2	Padrões de expressão dos anticorpos na pele normal do camundongo.....	44
Tabela 3	Padrões de expressão dos anticorpos após 7 dias da injeção do veneno de serpente.....	46
Tabela 4	Padrão de expressão dos anticorpos 21 dias após a injeção do veneno de serpente.....	48
Tabela 5	Padrão de expressão dos anticorpos 30 dias após a injeção do veneno de serpente.....	50
Tabela 6	Padrão de expressão dos anticorpos 45 dias após a injeção do veneno de serpente.....	52
Tabela 7	Padrão de expressão dos anticorpos 60 dias após a injeção do veneno de serpente.....	54

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Foto 1	Antes da injeção do veneno de serpente (macroscopia)	56
Foto 2	21 dias após a injeção do veneno de serpente (macroscopia).....	56
Foto 3	Antes da injeção do veneno de serpente (dermatoscopia).....	56
Foto 4	30 dias após a injeção do veneno de serpente (dermatoscopia).....	56
Foto 5	Antes da injeção do veneno de serpente (HE)	58
Foto 6	24 horas após a injeção do veneno de serpente (HE).....	58
Foto 7	72 horas após a injeção do veneno de serpente (HE).....	58
Foto 8	7 dias após a injeção do veneno de serpente (HE)	58
Foto 9	21 dias após a injeção do veneno de serpente (HE)	60
Foto 10	30 dias após a injeção do veneno de serpente (HE)	60
Foto 11	30 dias após a injeção do veneno de serpente (HE)	60
Foto 12	30 dias após a injeção do veneno de serpente (HE)	62
Foto 13	30 dias após a injeção do veneno de serpente (HE)	62
Foto 14	45 dias após a injeção do veneno de serpente (HE)	62
Foto 15	21 dias após a injeção do veneno de serpente (CK10).....	64

Foto 16	30 dias após a injeção do veneno de serpente (CK10)	64
Foto 17	21 dias após a injeção do veneno de serpente (CK16)	64
Foto 18	30 dias após a injeção do veneno de serpente (CK16)	64
Foto 19	30 dias após a injeção do veneno de serpente (CD34)	66
Foto 20	45 dias após a injeção do veneno de serpente (CD34)	66

1 INTRODUÇÃO

Os precursores do câncer cutâneo são chamados de lesões pré-malignas e constituem dermatoses com evolução em frequência acima da simples causalidade para carcinoma. Por existirem várias causas e formas de carcinoma espinocelular na pele, diversos estudos enfatizam diferentes aspectos da doença (MARKS et al, 1988; KWA et al, 1991; AZULAY & AZULAY, 1992; ACCIOLY-FILHO, 1995). Condições benignas não apresentam atipia celular em estágios precoces, porém carcinoma espinocelular e metástase podem se desenvolver posteriormente (SULICA & KAO, 1988; HAMMOND et al 1897; FRIEDMAN et al, 2003).

A maioria dos tumores induzidos experimentalmente em roedores são de origem celular escamosa (DEAMANT & IANNACCONE, 1987). O primeiro agente químico reconhecido como carcinogênico foi a fuligem (POTTER, 1974). Atualmente existe vasta literatura sobre a carcinogênese química experimental, principalmente utilizando pequenos mamíferos como modelo. Os modelos usualmente empregados são induzidos pela lesão celular e apoptose. Estas lesões podem ser reproduzidas por processos físicos, químicos ou secundários à inflamação e cicatrização (BROWN & BALMAIN, 1995). A quimiocarcinogênese cutânea tornou-se um protótipo clássico para o estudo molecular dos estágios de iniciação, promoção e progressão tumoral (MERK et al, 2004).

Os acidentes ofídicos constituem problema social freqüente em todo o mundo, particularmente nos países tropicais (CHIPPAUX, 1998). No Brasil estão

presentes principalmente as serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. O gênero *Bothrops* é o responsável por 90,4% dos acidentes (GUTIÉRREZ et al, 1980). Complexa mistura de toxinas, em sua maioria enzimas e peptídeos com atividades biológicas diversas, os venenos das serpentes, quando inoculados, promovem intensa lesão tissular (CHIPPAUX, 1998).

Mello et al, 2000, relataram o caso de um acidente com serpente, que após cicatrização da lesão, permaneceu área cicatricial assintomática e descamativa. Decorridos 23 anos, evoluiu para carcinoma espinocelular bem diferenciado. Embora os venenos de serpente não pareçam estar envolvidos na promoção de neoplasia, esses dados despertaram o interesse em avaliar experimentalmente as alterações induzidas pelas toxinas, nos diferentes estágios evolutivos pós-empeçonhamento, sendo necessário utilizar um protocolo em modelo animal com avaliação histopatológica e imuno-histoquímica para caracterização das alterações morfológicas induzidas cronicamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LESÃO CELULAR POR PEÇONHAS OFÍDICAS

Os acidentes ofídicos constituem problema social freqüente em todo o mundo, principalmente nos países tropicais, onde se tem o maior número deles. A incidência anual de acidentes com serpentes no mundo está estimada em cerca de 5 milhões, com aproximadamente 125.000 mortes (CHIPPAUX, 1998). No Brasil estão presentes principalmente as serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*, responsáveis por cerca de 20.000 casos de acidentes ofídicos relatados anualmente pelo Ministério das Saúde, sendo 90,4% destes causados por serpentes do gênero *Bothrops* (Jorge & Ribeiro, 1990).

Os venenos das serpentes são uma complexa mistura de toxinas, em sua maioria enzimas e peptídeos com atividades biológicas diversas que, quando inoculadas nos tecidos, promovem intensa lesão (CHIPPAUX, 1998). Estas peçonhas caracterizam-se por induzirem alterações circulatórias, intensa atividade proteolítica, coagulação do plasma sanguíneo, hemorragias, liberação de bradicinina e, freqüentemente, necrose dos tecidos. Os efeitos locais citotóxicos e hemorrágicos produzidos por estas peçonhas devem-se principalmente aos seus constituintes, que são: cardiotoxinas, fosfolipases A₂, enzimas proteolíticas, fatores hemorrágicos, pró-coagulantes e substâncias farmacologicamente ativas capazes de induzir a formação de bradicinina e a liberação de outros autacóides endógenos (Ownby, 1990). Os efeitos citotóxicos dos venenos crotalídeos foram estudados em vários tecidos e há poucas

descrições de lesões cutâneas nas literaturas nacional e internacional (MEBS et al, 1983; GUTIERREZ, 1990).

Mello e colaboradores (2000) relataram um caso de acidente ofídico com serpente do gênero *Bothrops* que, após completa recuperação da lesão ulcerada, apresentou persistência no local de área descamativa, assintomática, de cerca de 5mm. Decorridos 23 anos, evoluiu para CE bem diferenciado. Caso semelhante foi relatado em um menino na Arábia Saudita (MELLO et al, 2000). As transformações malignas das úlceras crônicas e cicatrizes relacionam-se, entre outros fatores, com o tempo de duração, sendo este tempo em média de 30 a 40 anos (FISHMAN & PACKER, 1991; SMITH et al, 2001).

Embora os venenos de serpente não pareçam estar envolvidos na promoção de neoplasia, foi descrita a contortrostatina, uma desintegrina derivada do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix*, cuja estrutura muito se assemelha à toxina isolada do veneno de *Bothrops jararaca*. Demonstrou-se que a toxina ofídica liga-se e bloqueia integrinas envolvidas na angiogênese, interação célula-célula e célula-MEC, interferindo no crescimento tumoral (ZHOU et al, 2000; MARKLAND et al, 2001).

2.1.1 Efeitos locais e sistêmicos - o papel das metaloproteinases

O envenenamento infligido pelas serpentes da família *Viperidae* é caracterizado por proeminente dano tecidual local com alterações patológicas complexas no sítio do emponhamento, desenvolvidas rapidamente após o acidente e resultando, freqüentemente, em seqüela permanente (WARRELL & HARVEY, 1995; GUTIÉRREZ et al, 1998). Estes efeitos são induzidos por vários componentes do veneno, tais como fosfolipase A₂ miotóxica (ANGULO et al,

1997), miotoxinas de baixo peso molecular (OWNBY, 1990) e metaloproteinases (BJARNASON & FOX, 1994; KAMIGUTI et al, 1998), entre outras. As metaloproteinases de peso molecular variável são responsáveis pelo efeito hemorrágico característico dos envenenamentos por crotalídeos e viperídeos. Estas enzimas estão também envolvidas na patogênese da mionecrose local, na lesão cutânea (RUCAVADO et al, 1995), no edema e em outras reações associadas com inflamação (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995), por meio da ativação das metaloproteinases da matriz endógena e na liberação de mediadores inflamatórios (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

Estruturalmente, as metaloproteinases das serpentes formam, com as desintegrinas, a subfamília das reprotinas (BJARNASON & FOX, 1994), dividindo a organização de domínios comuns (BJARNASON & FOX, 1994). As reprotinas são da família das metaloproteinases zinco-dependentes, ao lado das metaloproteinases da matriz (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

Todas estas metaloproteinases são sintetizadas como zimogêneos, nos quais o mecanismo de troca da cisteína inibe a atividade enzimática (BJARNASON & FOX, 1994). Zimogêneos são proteoliticamente processados para produzir enzima ativa (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000). A atividade hemorrágica tem sido associada à ação proteolítica enzimática, uma vez que a quelatação do zinco suprime tanto o efeito hemorrágico, quanto o proteolítico (BJARNASON & TU, 1978; BJARNASON & FOX, 1994). O papel dos outros domínios na toxicidade enzimática permanece obscuro, embora tenha sido demonstrado que as metaloproteinases maiores, aquelas com domínios desintegrina-símile e cisteína, possuem maior atividade hemorrágica do que as

1994). Parecem existir metaloproteinases desprovidas de atividade hemorrágica; contudo, estas observações não são conclusivas, sendo necessários mais estudos (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

2.1.2 O veneno das serpentes e seu efeito hemorrágico

Os sangramentos local e sistêmico são características comuns dos envenenamentos por serpentes crotalídeas e viperídeas e têm sido associados à ação das metaloproteinases na vasculatura (OWNBY, 1990; BJARNASON & FOX, 1994). Os métodos histológicos se mostram úteis em evidenciar o extravasamento das hemácias nos mais variados tecidos (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

Na maioria dos estudos investigativos descreve-se o mecanismo *per rhêxis* (do grego - ruptura), no qual as células endoteliais dos vasos capilares são afetadas rapidamente após a injeção das metaloproteinases, com o desenvolvimentos de fendas ou lesões nas células endoteliais, através dos quais os eritrócitos e outros componentes do sangue escapam para o espaço intersticial (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000). Extravasamento em vênulas podem ocorrer também como consequência da contração farmacologicamente induzida da célula endotelial e alargamento das junções intercelulares, com o consequente escape passivo de eritrócitos (OWNBY, 1990). Estudos ultra-estruturais em capilares e vênulas afetados são necessários para confirmar esta hipótese (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

2.1.3 O veneno das serpentes e as manifestações vésico-bolhosas

Manifestações vésico-bolhosas são achados freqüentes nos acidentes com as serpentes da família *Viperidae* (WARRELL & HARVEY, 1995). A patogênese desta alteração tem recebido pouca atenção, embora Rucavado et al (1998) tenham demonstrado que a injeção intramuscular da metaloproteinase de *B.asper* em camundongos induz à formação de bolhas. As bolhas aparecem rapidamente, com a separação entre a epiderme e a derme, permanecendo a membrana basal aparentemente presa à derme. A bolha pode ser seguida por ulceração e resposta regenerativa. Histologicamente, estas bolhas foram comparadas àquelas observadas na epidermólise bolhosa e penfigóide bolhoso, sugerindo que as metaloproteinases podem clivar alguns componentes-chave da junção dermo-epidérmica, provavelmente integrinas $\alpha_6\beta_4$, parte integrante dos hemidesmossomas, laminina ou algum componente dos filamentos de ancoragem (RUCAVADO et al, 1998).

Além de induzirem hemorragia, mionecrose e lesões cutâneas, as metaloproteinases dos venenos desempenham papel relevante na complexa resposta inflamatória dos emponhamentos. Quando injetadas no tecido muscular e quando incubadas com macrófagos *in vitro*, as metaloproteinases induzem o edema (GUTIÉRREZ et al, 1995) e a liberação de citocinas inflamatórias. Aparentemente metaloproteinases não-hemorrágicas também desempenham sua atividade, degradando a matriz extracelular, efeito que pode afetar a cicatrização e o processo regenerativo (GUTIERREZ & RUCAVADO, 2000). As metaloproteinases também ativam metaloproteinases da matriz ao clivar peptídeos e liberar formas ativas destas enzimas. Uma vez que as metaloproteinases da matriz são muito importantes para a degradação e

remodelamento da MEC (GUTIERREZ & RUCAVADO, 2000), o incremento da sua expressão na inflamação veneno-induzida pode contribuir com o dano tecidual futuro ao promover a degradação da MEC. O efeito da degradação da MEC pelas metaloproteinases dos venenos e da matriz endógena na patologia local dos empeçonhamentos permanece campo a ser investigado mais detalhadamente (GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

2.1.4 O veneno das serpentes e as fosfolipases A₂

Acidentes com víboras do gênero *Bothrops*, entre outros, causam grave edema local, seguido por necrose (GUTIÉRREZ et al, 1980). A injeção intradérmica do veneno também causa contínuo e prolongado acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no sítio da injeção (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995; GUTIERREZ et al, 1998). Os venenos de serpentes como *Naja* e *Bothrops* contêm, entre outras toxinas, as fosfolipases A₂. Foi demonstrado que as fosfolipases A₂ estimulam a liberação de agentes inflamatórios dos PMN por ações enzimáticas e não-enzimáticas na membrana celular (OWNBY, 1990; RUCAVADO et al, 2002). Entretanto, a causa primária do acúmulo de neutrófilos como parte da resposta inflamatória ao envenenamento por serpente continua em estudo (SUNDELL et al, 2003).

Além da quimioatração gerada pela fosfolipase A₂, outros fatores, tais como a proteólise da membrana basal vascular e da MEC pelas metaloproteinases dos venenos e proteinases liberadas dos PMN, podem ser importantes para o acúmulo de PMN no sítio da mordedura (GUTIERREZ & RUCAVADO, 2000).

A variabilidade na composição dos venenos entre as diferentes espécies de serpentes contempla a variação dos mecanismos de acúmulo de PMN induzidos por ação direta ou indireta destes constituintes químicos (SUNDELL et al, 2003). Outras substâncias, como metaloproteinases hemorrágicas, podem também contribuir com a estimulação neutrofílica e com a resposta inflamatória resultante (MOURA-DA-SILVA et al, 1996).

2.1.5 A angiogênese e a doença neoplásica

A histopatologia e a epidemiologia do câncer humano, assim como o estudo de modelos animais para a tumorigênese, têm permitido o conceito amplamente aceito de que as alterações genéticas e epigenéticas precisam se acumular para a progressão da malignidade. A formação de novos vasos sangüíneos (angiogênese tumoral) foi reconhecida, aliada à proliferação capilar e à redução da apoptose, como essencial para o crescimento e expansão progressivos dos tumores sólidos (FOLKMAN, 1995a).

A maioria dos tumores em humanos persiste *in situ* durante meses a anos sem neovascularização, porém torna-se vascularizado quando um subgrupo de células tumorais muda-se para um fenótipo angiogênico. Na fase pré-vascular, o tumor raramente alcança tamanhos maiores que 2 a 3 mm, e chega a abrigar mais de um milhão de células (FOLKMAN, 1995b). As células dos tumores pré-vasculares podem se replicar tão rapidamente quanto aquelas dos tumores vascularizados e em expansão, contudo, sem o crescimento de novos vasos, a taxa de proliferação atinge um equilíbrio com a taxa de morte celular (FOLKMAN, 1995c; HOLMGREN et al, 1995).

A mudança para o fenótipo angiogênico envolve alterações no equilíbrio local entre os reguladores do crescimento da microvasculatura (DAMERON et al, 1994). As células tumorais podem expressar um ou mais dos reguladores positivos da angiogênese, podem mobilizar uma proteína angiogênica da matriz extracelular, podem recrutar células como os macrófagos que são produtores de proteínas angiogênicas, ou podem combinar os mecanismos. De todas as proteínas angiogênicas, as mais comumente encontradas nos tumores são o fator de crescimento fibroblástico básico (FCFb) e o fator de crescimento vascular endotelial (também conhecido como fator da permeabilidade vascular). A atividade angiogênica destes fatores pode ser sinérgica (PEPPER et al, 1992).

A regulação positiva de um fator angiogênico por si só não é suficiente para um tumor se tornar angiogênico. Determinados reguladores negativos ou inibidores do crescimento vascular devem ser inibidos (DAMERON et al, 1994). Estes inibidores endógenos são parte de um extensivo grupo de supressores que normalmente defendem o endotélio vascular do estímulo mitogênico (JAFFE, 1987). Durante a angiogênese, contudo, as células endoteliais capilares podem proliferar tão rápido quanto as células da medula óssea. A proliferação do endotélio celular pode também ser regulada ou reprimida por pericitos, por meio do seqüestro de mitógenos potentes na MEC (FOLKMAN, 1995b), pela alteração na forma celular endotelial que reduz a sensibilidade das células aos fatores de crescimento e por determinadas integrinas endoteliais (BROOKS et al, 1994).

A angiogênese persistente desempenha papel importante em estados patológicos, como na retinopatia diabética, artrite reumatóide e, em especial, como pré-requisito no crescimento dos tumores sólidos e metástases à distância (FOLKMAN, 1995a).

O VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), proteína considerada a principal mediadora do crescimento vascular e angiogênese, tanto em condições fisiológicas, como no desenvolvimento embrionário, maturação placentária e resposta endometrial, quanto em condições patológicas, atua sobre o endotélio estimulando a mitogênese celular e induz potente permeabilidade capilar *in vivo* e *in vitro* (YUMIKO et al, 1999).

O VEGF é produzido e secretado por vários tipos celulares normais, como músculo liso, células do córtex adrenal e luteínicas. Mas também observa-se a sua produção em células tumorais. Anticorpos direcionados contra o VEGF podem inibir o crescimento de uma variedade de tumores, porém a produção de VEGF não é inibida *in vitro* pela endostatina, uma das moléculas mais promissoras para o tratamento neoplásico (SUND et al, 2005; ISAYEVA et al, 2005; KIRSCH et al , 2005).

O crescimento tumoral é angiogênese-dependente e a endostatina, produto da clivagem do colágeno XVIII, que inibe fortemente a angiogênese tumoral, não foi capaz de reduzir os níveis de VEGF em camundongos submetidos a trauma cutâneo. Em contraste, a terapia pró-angiogênica é a expectativa para doenças isquêmicas, incluindo-se a oclusão aterosclerótica dos membros inferiores, angina pectoris/infarto agudo do miocárdio, com o objetivo de recuperar o tecido isquêmico pelo desenvolvimento de circulação colateral (SUND et al, 2005).

2.1.5.1 A angiogênese e o veneno das serpentes

O Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, descreveu o seqüenciamento do DNA codificador de uma substância semelhante ao VEGF, com similaridade ao

dos vertebrados. O VEGF de serpentes parece ser distribuído de forma onipresente entre os venenos das serpentes (AZEVEDO et al, 2001).

Os venenos das serpentes contêm peptídeos e proteínas que atuam em mecanismos fisiológicos do corpo. Muitas destas proteínas são sítio-específicas em suas ações, o que as torna importantes ferramentas para os avanços terapêuticos e biológicos, sendo o exemplo mais conhecido o desenvolvimento dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. Muitas destas enzimas são metaloenzimas usualmente chamadas metaloproteases. Elas estão envolvidas em etapas importantes do processo de lesão celular envolvendo tecido conjuntivo e as células vasculares, tendo como alvo as integrinas (OWNBY, 1990; BJARNASON & FOX, 1994). Mais recentemente eles têm sido usados para o desenvolvimento de inibidores da agregação plaquetária e coagulação sanguínea, sem deixar de mencionar as moléculas pró-coagulantes. O seu efeito angiogênico contrasta com o já demonstrado efeito inibitório sobre o crescimento de células tumorais de câncer de mama e ovário pela contortostatina (MUKHOPADHYAY et al, 1999; ZHOU et al, 2000; THOMAS et al, 2001).

2.2 QUIMIOCARCINOGENESE E MODELOS EXPERIMENTAIS

2.2.1 Evolução no tempo

O primeiro agente químico reconhecido como carcinogênico foi a fuligem, quando Percival Potts observou a alta incidência de carcinoma escrotal entre os jovens chamineiros (POTTER, 1974). Atualmente existe vasta literatura sobre a carcinogênese química experimental, principalmente utilizando pequenos mamíferos como modelo.

O exato mecanismo para o desenvolvimento dos tumores malignos tem sido matéria de estudo e especulação ao longo dos anos. Yamagiwa e Ichikawa, em 1918, foram os primeiros a produzir modelos experimentais de CE, utilizando o alcatrão em coelhos e camundongos (SCHWARTZ & STOLL, 1999). O câncer cutâneo pode ser induzido em uma variedade de animais, mas a maioria dos estudos foram realizados na pele do camundongo (DI GIOVANNI, 1992). Os modelos usualmente empregados no desenvolvimento de neoplasias são induzidos pela lesão celular e apoptose. Estas lesões podem ser reproduzidas por processos físicos, químicos ou secundários à inflamação e cicatrização. O uso de modelos animais tem se mostrado eficaz na elucidação de eventos moleculares responsáveis pelos vários estágios do desenvolvimento tumoral. Atualmente, os camundongos transgênicos oferecem um novo caminho, permitindo refinamento do estudo e detalhamento dos eventos *in vivo* (BROWN & BALMAIN, 1995). Informações precisas, considerando-se a contribuição de genes específicos a estágios particulares da tumorigênese, são desenvolvidas pela testagem de protocolos de carcinogênese na pele de camundongos transgênicos ou geneticamente modificados (DIUGOSZ & YUSPA, 1999).

2.2.2 Carcinogênese em multi-estágios

Os tumores cutâneos desenvolvem-se com relativa rapidez em animais (2 meses em média) após exposição única ou múltipla a um carcinógeno, seja por administração tópica seja sistêmica (OWENS et al, 1999). O desenvolvimento do câncer cutâneo pode ser subdividido em estágios, cada um diferindo no seu mecanismo subjacente e nos diferentes tipos de exposição. Na evolução mais comum dos tumores cutâneos, múltiplos tumores benignos aparecem rapidamente e somente alguns evoluem para carcinomas após um período de latência. Os tumores epidérmicos são os primeiros a se desenvolverem em outras espécies, à semelhança dos camundongos. Contudo, hamsters e porcos da guiné estão propensos à formação de melanoma sob certas condições experimentais (DIUGOSZ & YUSPA, 1999). Ratos, mais comumente, desenvolvem carcinomas basocelulares após a exposição a baixas doses de carcinógenos e carcinoma de células escamosas após a exposição a doses elevadas (DIUGOSZ & YUSPA, 1999).

Esta determinação dependente do tipo celular nos tumores dos roedores pode ser análoga à distribuição tumoral dos cânceres cutâneos em humanos, nos quais a ocorrência predominante do CE após a terapia com PUVA ou exposição a carcinógeno químico é contrastada com a ocorrência mais comum do carcinoma basocelular na população exposta à luz solar (GALLAGHER et al, 1996).

A quimiocarcinogênese cutânea tornou-se um modelo clássico para o estudo molecular dos processos de carcinogênese. A maioria dos agentes químicos são compostos de pequeno peso molecular que precisam ser metabolizados em espécies altamente reativas para se tornarem carcinógenos (CONNEY, 2003). As enzimas da metabolização xenobiótica envolvidas neste

processo foram encontradas na pele, assim como as proteínas transportadoras para o influxo e efluxo desses compostos (BARON et al, 2001; SCHIFFER et al, 2003). Em particular, técnicas de dermatotoxicologia molecular expandem o conhecimento sobre essas proteínas e seus genes e permitem novas possibilidades para o estudo do metabolismo em órgãos extra-hepáticos como a pele (MERK et al, 2004).

Para a quimiocarcinogênese cutânea, acredita-se que, originando-se de uma única célula mutante, o câncer se desenvolve a partir de estados pré-neoplásicos. Os modelos animais envolvem acúmulo progressivo de alterações genéticas até alcançarem a tumorigênese. Há evidências de que os estágios de iniciação, promoção e progressão envolvem qualitativamente diferentes tipos de eventos moleculares. A iniciação é evento irreversível, que ocorre após uma única exposição cutânea a um carcinógeno. Promotores tumorais atuam não como mutagênicos, mas promovem a seleção de células iniciadas e induzem a proliferação de lesões pré-malignas. A progressão tumoral caracteriza-se pela conversão das lesões pré-malignas em carcinomas, sendo necessárias mutações adicionais para este processo (MERK et al, 2004).

2.2.2.1 Iniciação tumoral

Um importante passo na iniciação tumoral é a interação que ocorre entre o agente químico e o DNA da célula alvo. Esta reação resulta em alteração irreversível dos genes envolvidos na regulação da diferenciação terminal. A maioria dos químicos com atividade de iniciação precisam ser ativados antes de induzirem dano ao DNA, e tanto a pele humana quanto a animal expressam o sistema ativador que catalisa o metabolismo xenobiótico (MERK et al, 2004).

A iniciação pode resultar de uma exposição limitada, geralmente doses baixas, em exposições únicas ou por curta duração. Na ausência de tratamento posterior, as células iniciadas podem não evoluir para o desenvolvimento tumoral, mas as alterações celulares persistem por toda a vida (DLUGOSZ & YUSPA, 1999). A exposição à dose elevada ou a doses repetidas de um iniciador geralmente levará à formação tumoral. A irreversibilidade do estado de iniciação e a sua propriedade de herança (progênie das células expostas permanecem iniciadas) implicam fortemente no mecanismo mutacional para este estágio da carcinogênese (DLUGOSZ & YUSPA, 1999).

A ativação mutagênica do protooncogene Harvey-ras (HA-ras) é considerada um dos eventos mais precoces em associação com a iniciação de tumores cutâneos em camundongos pelo hidrocarboneto policíclico aromático 7, 12 dimetilbenz[alpha]antraceno e o iniciador puro etil carbamato (uretano), agentes comumente utilizados na carcinogênese química (BOWDEN & KRIEG, 1991). Em diversos estudos, a presença do protooncogene HA-ras ativado na pele normal de camundongo iniciado com benzopireno e promovido com TPA demonstra que a ativação do HÁ-ras pode preceder o início da neoplasia. Este achado indica que a presença da mutação no HA-ras na epiderme pode não ser suficiente para desencadear o desenvolvimento neoplásico. Possivelmente, fatores adicionais são necessários, em cooperação com o HA-ras ativado, na função de gatilho para a tumorigênese (WEI et al, 1999). Pesquisas prévias sugeriram que para a formação do papiloma é necessária a cooperação de outros estímulos proliferativos (BAILLEUL et al, 1990) ou vias independentes da HA-ras mediada, além da ativação do protooncogene ras (JHAPPAN et al, 1994).

2.2.2.2 Promoção tumoral

O estágio de promoção envolve a produção e a manutenção de um estado crônico de hiperplasia e proliferação celular e, finalmente, a expansão clonal seletiva de células iniciadas. A principal característica de um agente promotor testado adequadamente é a sua habilidade em induzir hiperplasia após várias aplicações (DI GIOVANNI et al, 1994).

Os promotores tumorais não-carcinogênicos, quando aplicados sobre a pele iniciada de camundongos, resultam na erupção de múltiplos papilomas benignos, cada um deles representando expansão clonal de uma única célula iniciada. Os agentes promotores devem ser aplicados topicamente, repetidamente e com frequência particular. Desta forma, os efeitos de exposições individuais a promotores são reversíveis, sugerindo que alterações transitórias na epiderme são necessárias para promover o crescimento das células iniciadas. Fato biológico análogo às exposições solares repetidas resultando na seleção clonal de queratinócitos humanos com mutação do p53 (JONASON et al, 1996).

Os agentes promotores cutâneos são variados em estrutura e incluem estímulos físicos, como ferimento e abrasão. Os promotores mais extensivamente estudados são os ésteres de forbol, como o 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), o álcool diperteno derivado de plantas e os ingredientes ativos no óleo de cróton (MANCUSO et al, 2004). Vários promotores tumorais cutâneos experimentais são encontrados no ambiente humano como produtos naturais e que são considerados irritantes cutâneos (FUJIKI & SUGGIMURA, 1987). A radiação ultravioleta, tão bem quanto a antralina e o peróxido de benzoíla, ambos utilizados na terapêutica médica, são considerados potentes promotores em roedores (DLUGOSZ & YUSPA, 1999). A exposição humana a promotores

tumorais ativos na pele de camundongos não é, conseqüentemente, fato incomum. A contribuição do ambiente ou de agentes promotores medicinais na incidência do câncer cutâneo em humanos permanece desconhecida, contudo a freqüência de formação de tumores na carcinogênese experimental está relacionada à fase de promoção (MERK et al, 2004).

2.2.2.3 Progressão tumoral

A progressão é o principal estágio tempo-dependente do desenvolvimento do câncer, sendo freqüentemente multifocal. Na carcinogênese cutânea de camundongos, a conversão maligna é detectada em somente 2 a 4% dos papilomas e parece decorrer de alteração intraclonal envolvendo uma única célula. A conversão pode ser acelerada com o tratamento da área peri-papiloma com mutágenos tópicos ou sistêmicos, incluindo agentes iniciadores (DLUGOSZ & YUSPA, 1999). Crescentes aneuploidia e atipia morfológicas são documentados nos papilomas de camundongos em progressão maligna (BALMAIN & HARRIS, 2003). Aberrações cromossômicas são freqüentes e comumente envolvem alterações nos cromossomas 6, 7 e 11 nos camundongos (BALMAIN et al, 1992).

2.2.3 Suscetibilidade

Apesar da validade dos estudos experimentais, substâncias químicas com evidências epidemiológicas suficientes para a carcinogênese em humanos mostram resultados limitados em estudos com animais de experimentação (BERGERET et al, 2000). Destaca-se como principal exemplo o metalóide arsênico. Em 1887, Sir Jonathan Hutchinson reconheceu a associação entre a

administração do arsênico e o subsequente desenvolvimento de malignidade cutânea e interna (NEUBAUER, 1974). De todos os carcinógenos humanos, era de se esperar que o arsênico estivesse no topo da lista, frente a suas fortes indicações em estudos epidemiológicos detalhados (GUO et al, 2001; CHEN et al, 2003). Contudo, experimentos envolvendo ratos e camundongos expostos ao arsênico, por diferentes rotas, nunca foram capazes de demonstrar surgimento de neoplasias benignas ou malignas (SIMENOVA et al, 2000). A justificativa mais aceita é a de que o tempo de vida dos animais não seria suficientemente grande para o longo período de latência necessário à tumorigênese arsenical (SCHWARTZ & STOLL, 1999).

A despeito das discrepâncias existentes entre a carcinogênese humana e de camundongos, particularmente considerando-se as deficiências dos modelos animais para a detecção de carcinógenos ou predição de risco, um dos mais surpreendentes resultados das pesquisas nos últimos 20 anos vem sendo o grau de semelhança genética e biológica entre o desenvolvimento neoplásico em camundongos e humanos (BALMAIN & HARRIS, 2003). Embora os camundongos sejam pequenos animais com alta taxa metabólica e sobrevida curta, eles desenvolvem tumores nos mesmos tecidos e na maioria dos casos com extraordinária similaridade histopatológica com os humanos (DRAGAN & PITOT, 1992). O espectro genético dos eventos na carcinogênese humana é, com raras exceções, surpreendentemente conservado nos camundongos (BALMAIN & HARRIS, 2003). Dada a excepcional preservação do controle do ciclo celular e dos padrões de sinalização que levam ao descontrole no crescimento específico de determinado tipo celular, é singular a possibilidade de os camundongos desenvolverem tumores malignos exibindo múltiplas alterações genéticas em

pequeno período de tempo (semanas a meses), enquanto tumores sólidos agressivos em humanos podem requerer muitos anos para alcançar estágio equivalente (BALMAIN & HARRIS, 2003).

Atribui-se a carcinogênese acelerada dos camundongos à sua contrastante instabilidade celular, quando comparada com a dos humanos. Embora a frequência das mutações seja semelhante entre humanos e roedores, as células dos camundongos transformam-se com mais facilidade em culturas, seja por exposição a químicos exógenos ou por transferência de oncogenes. Especula-se que esta diferença esteja relacionada à menor eficiência no reparo do DNA, reduzido controle da estabilidade genética e descontrole da expressão gênica por processos como a metilação do DNA (OWENS et al, 1999). Outra possível explicação para as diferenças homem-camundongo está no mecanismo pelo qual as células tornam-se imortalizadas. Em ambos os casos as células envelhecem e morrem após definido número de replicações *in vitro*, mas a frequência com que as células dos camundongos escapam desta morte programada é muito maior (BALMAIN & HARRIS, 2003).

A suscetibilidade para o desenvolvimento tumoral varia entre os indivíduos na população humana. Esta variabilidade pode também ser encontrada entre as diferentes linhagens de camundongos, particularmente no modelo de quimiocarcinogênese. O camundongo da raça Sencar é considerado o mais sensível para o estudo da carcinogênese cutânea, contudo pouco se sabe sobre os seus genes de suscetibilidade tumoral, principalmente aqueles envolvidos na progressão. Estudos utilizando o cruzamento de linhagens diferentes da mesma raça (Sencar) indicam que o desenvolvimento de papilomas, promoção tumoral e

a sua conversão em CE (progressão), são regulados por diferentes genes (STERN et al, 2002).

Os determinantes da suscetibilidade são multigênicos, estágio específicos, dependentes do protocolo de carcinogênese utilizado e, no caso de eventos iniciadores, de propriedades intrínsecas dos queratinócitos (WOODWORTH et al, 2004).

Sabe-se que a morte celular programada ocorre não somente durante o desenvolvimento normal e remodelação tissular, mas também na neoplasia. Apesar do conhecido papel da apoptose na prevenção da proliferação de células malignas, uma correlação positiva entre a progressão tumoral e a presença de células apoptóticas tem sido encontrada em diferentes tipos de neoplasias malignas, incluindo tumores epiteliais. Na pele normal do camundongo, a função da apoptose permanece não totalmente elucidada. Em estudo para a contagem de células apoptóticas nos tumores cutâneos de camundongos Sencar com diferentes suscetibilidades para progressão tumoral, gerados em protocolo de quimiocarcinogênese em dois estágios (iniciação e promoção), os resultados mostraram que o número de células apoptóticas foi maior nos papilomas de camundongos suscetíveis à progressão tumoral (STERN et al, 2002).

Uma das maiores vantagens dos modelos animais para a carcinogênese está em fornecer as provas da relação causa-efeito entre a exposição ao carcinógeno, alterações genéticas e eventos biológicos que conduzem à neoplasia ou não.

2.2.3.1 Imunidade

O conceito de que, além dos agentes carcinógenos, existe também a relação com o sistema imune foi sugerido por Macfarlane Burnett, 1969, que produziu a teoria da vigilância imunológica (MACKIE, 1998). As contribuições do sistema imune na suscetibilidade para a quimiocarcinogênese cutânea continua pouco elucidada. Contudo, camundongos nus, deficientes de imunidade celular, revelam suscetibilidade aumentada para tumores quimicamente induzidos (ANDERSON & RICE, 1987).

2.3 LESÕES EPITELIAIS PRÉ-MALIGNAS E MALIGNAS

2.3.1 Lesões pré-malignas dos queratinócitos

Os precursores do câncer cutâneo são chamados de lesões pré-malignas e constituem dermatoses com evolução em freqüência acima da simples causalidade para carcinoma. Por existirem várias causas e formas de CE na pele, diversos estudos enfatizam diferentes aspectos da doença (ACCIOLY-FILHO, 1995).

Confere-se o termo pré-cancerose à tese de Dübrenilh, apresentada no 3^o Congresso Dermatológico Internacional em Londres, no ano 1896, de onde foram aceitos a nomenclatura e o conceito (SCHWARTZ & STOLL, 1988). BLOCH observou, em 1923, que o conceito de pré-cancerose era especialmente bem-vindo, devido ao seu valor prático. “Denominamos pré-cancerosas aquelas alterações patológicas tissulares nas quais, não sendo câncer, mostram tendência mais cedo ou mais tarde para se converter em um verdadeiro câncer” (BLOCH, 1999).

Determinadas alterações na epiderme são importantes devido ao seu potencial em progredir para franca malignidade. Algumas condições, como a ceratose actínica e a leucoplasia de superfícies mucosas, podem demonstrar relativamente pouca evidência de atipia celular. Outras, como a doença de Bowen ou a eritroplasia de Queyrat, apresentam características microscópicas do carcinoma intra-epidérmico desde o seu início, confinadas à região acima da junção dermo-epidérmica (MACKIE, 1998).

A pele submetida a injúria por radiação ionizante, altas temperaturas, exposição a compostos carcinogênicos e as ceratoses decorrentes da ingestão de

compostos arsenicais inorgânicos apresentam, todas, o potencial de malignidade. Escaras com evolução de longo tempo, fístulas e úlceras podem ser sítios de transformação maligna. Condições benignas como líquen escleroso vulvar, cicatrizes de queimadura, cicatrizes de leishmaniose, lúpus eritematoso discóide e psoríase não apresentam atipia celular em estágios precoces, porém carcinoma

malignos são usualmente de origem monoclonal (DEAMANT & IANNACCONE, 1987; REDDY & FIALKOW, 1988). Exceção para aqueles induzidos por exposição a carcinógenos extremamente potentes, como os hidrocarbonetos aromáticos.

A maioria dos tumores cresce a partir de uma única célula, mas a frequência da transformação é dependente da dose do carcinógeno empregado sobre as células alvo. Uma das funções da carcinogênese é produzir a expansão clonal substancial de células transformadas, em detrimento do recrutamento de células normais dentro da massa tumoral. Geralmente, os tumores malignos possuem o genótipo dos seus precursores benignos (TAGUCHI et al, 1984).

Inúmeros marcadores fenotípicos estão associados com estágios específicos da carcinogênese em tumores de roedores e humanos. Nos camundongos, a atividade de enzimas como a γ -glutamil transpeptidase está elevada em papilomas displásicos e encontra-se associada com evidência citogenética de aneuploidia (ALDAZ et al, 1988). Elevações extraordinárias da atividade da ornitina descarboxilase, enzima ligada à proliferação epidérmica, são detectadas em neoplasias cutâneas de humanos e camundongos, por outro lado, a sua supressão na pele de camundongos transgênicos está relacionada com a produção de ceratoacantomas (DLUGOSZ & YUSPA, 1999).

De acordo com ACCIOLY, 1995, no CE a falta de correlação entre a diferenciação morfológica e a expressão de citoqueratinas reflete alterações no controle da diferenciação celular, parecendo indicar que mudanças na expressão dos genes de queratina ocorrem na carcinogênese da célula escamosa. O uso de anticorpos monoclonais para citoqueratinas se mostrou útil na avaliação das alterações da diferenciação epidérmica nas lesões pré-malignas e malignas dos

queratinócitos. A imunofenotipagem com as citoqueratinas 10, 14 e AE1 pode ajudar a definir a maturação escamosa anormal na epiderme adjacente ao CE (ACCIOLY-FILHO, 1995).

Thorup e colaboradores (1998) observaram que o desenvolvimento do CE relaciona-se com alterações na expressão de receptores e ligantes envolvidos na interação célula-célula e célula-matriz extracelular- MEC (THORUP et al, 1998). Desta forma, a expressão de integrinas específicas, avaliada por técnicas como imunoperoxidase ou imunofluorescência indireta, pode ser utilizada como marcadora do desenvolvimento de malignidade. Um estudo mostrou a contribuição das integrinas $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_1$ na adesão e migração celular do CE (KOIVISTO et al, 2000). A perda ou a redução na expressão de integrinas, nos carcinomas, já havia sido demonstrada previamente (MUKHOPADHYAY et al, 1994; SERPA, 1999; THOMAS et al, 2001). A expressão da integrina $\alpha_6\beta_4$ na célula basal está aumentada nos CE de roedores e humanos (VAN WAES et al, 1991).

Tumores escamosos de origem murina e humana normalmente secretam quantidade aumentada de fatores do crescimento transformantes e apresentam número elevado de receptores para estes fatores. Por outro lado, células de tumores malignos podem se tornar irresponsivas a reguladores negativos do crescimento celular como o fator de crescimento transformante- β (DLUGOSZ & YUSPA, 1999).

2.3.3.1 Marcadores de diferenciação epidérmica

As citoqueratinas constituem uma família complexa de proteínas. São os constituintes protéicos dos filamentos intermediários das células epiteliais; tem-se

afirmado que elas constituem o melhor marcador de diferenciação epitelial e o mais específico (MOLL, 1987). As citoqueratinas epiteliais são as mais estudadas e conhecidas. São designadas pelo seu peso molecular ou por um número (segundo catálogo de MOLL et al, 1982).

Estudos imuno-histoquímicos com anticorpos monoclonais mono ou poliespecíficos revelam padrão de citoqueratina único para cada uma das camadas da epiderme. Resultados semelhantes também foram observados com o estudo da epiderme de roedores em desenvolvimento, desde o período de estratificação tissular até a completa queratinização (DALE et al, 1976; MICHAEL et al, 1994; ACCIOLY-FILHO, 1995).

Na pele normal formada por várias camadas, a expressão das citoqueratinas se altera à medida que as células movem-se de um compartimento para o outro. A camada basal do camundongo sintetiza primariamente o par citoqueratina 5 (CK5)- 58 KD e CK14- 50 KD. Células das camadas suprabasais suprimem a expressão das CKs 5 e 14 e iniciam a síntese de CKs específicas de diferenciação CK1- 68 KD e CK10- 56.6 KD (CAULÍN et al, 1993). Foram encontradas alterações no padrão de expressão das citoqueratinas durante o desenvolvimento tumoral na carcinogênese quimicamente induzida de camundongos. A perda da CK1/CK10 é um marcador bem estabelecido durante a progressão de papilomas benignos para carcinomas. Outras alterações observadas nos tumores epidérmicos de camundongos são a síntese aberrante de CKs que normalmente não se expressam na pele do animal adulto, como as CK 6 e 16 (CAULÍN et al, 1993).

Citoqueratina 10

A CK10 representa uma CK ácida de 56,6 quilodáltons (KD), que conjuntamente com a CK1 formam um par de expressão suprabasal, constituindo a diferenciação do tipo cutâneo (MOLL et al, 1982; CRIBIER & GROSSHANS, 1993; MOLL, 1993). LEIGH et al, 1993, demonstraram, por meio do uso de anticorpos monoclonais específicos para CK 1 e 10, que estes reagem com a pele suprabasal, incluindo a porção superior da bainha folicular externa no folículo piloso até o nível do ducto sebáceo e células da mucosa oro-genital. Estudo realizado por MING et al, 1994, em ratos demonstrou que a citoqueratina 10 se liga fortemente ao envelope cornificado e pode, assim, ser um substrato de ligação cruzada, interagindo de forma a aumentar a integridade estrutural do extrato córneo. A diferenciação específica das CKs 1 e 10 estão comumente ausentes ou diminuídas nos carcinomas, enquanto que queratins não epidérmicas como 19, 8 e 18 podem ser expressas de forma aberrante (DLUGOSZ & YUSPA, 1999).

Citoqueratina 14

A citoqueratina 14, uma proteína ácida de 50 KD, que com a citoqueratina 5 (58 KD) constitui um par, serve para distinguir tipos celulares de epitélio estratificado daqueles de epitélio simples. Acredita-se que a citoqueratina 14 seja expressa uniformemente em todas as células de epitélios escamosos queratinizantes (MOLL et al, 1982; NELSON & SUN, 1983; CRIBIER & GRASSHANS, 1993; MOLL, 1993). Na pele, todos os queratinócitos são positivos das células basais até o extrato granuloso; o extrato córneo é negativo. As células da bainha externa do folículo piloso são todas positivas até o bulbo; as células da

bainha interna são negativas. Nas glândulas sebáceas, as células são todas positivas para esta proteína (PURKIS et al, 1990). Acredita-se que a associação constante do par CK5/CK14 com as células basais tenha uma possível função específica para estas citoqueratinas no reforço dos epitélios sob *stress* físico (PURKIS et al, 1990).

Citoqueratina 16

A citoqueratina 16 é ácida, de 48 KD, que conjuntamente com o outro elemento de seu par, a citoqueratina 6, são considerados marcadores da hiperproliferação tissular (WEISS et al, 1984). KORGE et al, 1990, no entanto, sugere que apenas a citoqueratina 16 representa de fato uma citoqueratina relacionada a proliferação em culturas de queratinócitos epidérmicos humanos. As CKs 6 e 16 apresentaram expressões opostas (aumento da CK6 e diminuição da CK 16) frente à adição de retinóides no meio de cultura. Segundo MARKEY et al, 1991, as neoplasias tanto humanas quanto murinas expressam queratinas 6 e 16, proteínas que não são detectadas na epiderme normal, mas que estão relacionadas a um estado hiperproliferativo.

Citoqueratina 19

A citoqueratina ácida 19 (40 KD), a menor entre todas as CKs, foi primeiro detectada em linhagens de carcinomas de células escamosas (WU & RHEINWALD, 1981). É geralmente considerada como sendo característica de epitélios simples, tais como intestino, ductos coletores renais, vesícula biliar e células secretoras glandulares. Possui uma distribuição tissular bastante ampla, e, atualmente, já se sabe de sua presença também em epitélios estratificados e

escamosos (mucosa oral, esofágica, ectocérvice, por exemplo). A epiderme interfolicular não apresenta imunorreatividade para a CK 19, a não ser por escassas células de Merkel presentes junto à camada basal. Marcação intensa, mas heterogênea, nas células basais foi encontrada na profundidade da bainha externa do folículo piloso, numa região próxima ao istmo (LANE et al, 1991). A extensão da positividade para a CK 19 nesta localização está sujeita a variações em função do local do corpo e depende do ciclo piloso (LANE et al, 1991). Acredita-se que estas células CK19 (+) possam representar células tronco ou células pós-tronco (STASIAK et al, 1989; LANE et al, 1991), envolvidas no processo de regeneração epitelial após dano cutâneo. Por suas características estruturais e localização em áreas caracterizadas por labilidade ou variabilidade na diferenciação celular, conforme indicado pela presença de múltiplos fenótipos de queratina em íntima proximidade, foi sugerido que a CK19 pudesse representar um marcador para o estado indeterminado de diferenciação e servir, dependendo da demanda local, como uma fonte de vários tipos celulares (STASIAK et al, 1989).

Clone AE1

O clone AE1 representa um coquetel constituído pelas citoqueratinas ácidas 10, 14, 16 e 19. É um dos preparados mais amplamente utilizados na demonstração da natureza epitelial de tumores morfológicamente indiferenciados. Praticamente todos os carcinomas são positivos para AE1. Importantes exceções são os tumores da córtex adrenal e o carcinoma hepatocelular, que expressam apenas citoqueratinas 8 e 18 (ALVES et al, 1999). O anticorpo AE1 reconhece epítomos específicos para a camada basal e suprabasal na epiderme, havendo

também marcação da bainha externa do folículo piloso e porções ductais excretoras das glândulas sudoríparas écrinas (ACCIOLY-FILHO, 1995; ALVES et al, 1999).

2.3.3.2 Marcadores celulares da derme

Proteína S-100

O termo “proteína S-100” foi originalmente empregado na descrição de uma fração protéica ácida do cérebro bovino e assim designada por sua solubilidade em sulfato de amônia saturado (ISOBE & OKUYAMA, 1981). Atualmente, admite-se a existência de pelo menos 17 diferentes proteínas pertencentes à família S-100, codificadas por genes localizados no cromossoma 1q21 (SCHAFER & HEIZMANN, 1996). Estas proteínas de baixo peso molecular e ligantes de cálcio iniciam vários processos celulares, tais como divisão, motilidade, secreção, síntese protéica e permeabilidade de membrana (SCHAFER & HEIZMANN, 1996). Embora inicialmente considerada como específica do sistema nervoso de mamíferos, posteriormente se demonstrou ter, de fato, uma distribuição muito mais ampla, estando presente - além das células gliais - nas células de Schwann, condrócitos, melanócitos, células de Langerhans e em outros tumores relacionados (RIDINGER et al, 1998; KULSKI et al, 2003). Na epiderme, a proteína S-100 foi detectada em melanócitos na camada basal e nas células de Langerhans nas camadas mais superficiais. O núcleo e o citoplasma destas células se mostram positivos e processos dendríticos se tornam especialmente proeminentes após técnica imuno-histoquímica. Na derme, tanto o núcleo como o citoplasma das células de Schwann se revelam positivos, tal como

os corpúsculos de Paccini e Meissner. Quando uma inflamação crônica está presente na derme, células reticulares interdigitantes exibem imunorreatividade

em seu citoplasma a subunidade a, sendo o fator XIIIa considerado o seu marcador mais distintivo (CERIO et al, 1989). A sua função nos dendrócitos dérmicos permanece em estudo, porém dados sugerem que ele estimule o crescimento de fibroblastos e de células neoplásicas *in vitro*, podendo funcionar como fator de crescimento. Outros consideram o fator XIIIa apenas como marcador de células fagocíticas (CERIO et al, 1989).

3 JUSTIFICATIVA

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maior morbidade entre humanos do que qualquer outro grupo de serpentes existentes no novo mundo. A espécie mais importante na América do Sul é a *B. jararaca*. No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% de todos os acidentes, com letalidade em torno de 0,31% (CAMEY et al, 2002). As lesões teciduais agudas causadas pelo envenenamento da serpente *Bothrops jararaca* já foram bem caracterizadas em diversos trabalhos. Tomando-se como referência um caso de acidente ofídico com serpente do gênero *Bothrops*, no Brasil, e de outro caso semelhante em menino na Arábia Saudita (MELLO et al, 2000), além de cerca de outros 28 casos- não publicados-no INCA (Instituto Nacional do Câncer), todos de lesões dermatológicas cicatrizadas que evoluíram para CE, despertou-se o interesse em avaliar experimentalmente as alterações induzidas pelas toxinas, nos diferentes estágios pós-empeçonhamento de serpente.

Em estudo experimental de indução de lesão pulmonar pelo veneno de *B. jararaca*, realizado no Laboratório de Toxinas Ofídicas do Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da UFRJ, injetado por via intravenosa, na cauda de camundongos, observou-se, durante a execução dos experimentos, que naqueles animais em que a injeção do veneno (0,1-4 μ g/g) não era corretamente administrada na veia, ocorria resposta inflamatória local e posterior aumento da espessura local. Esta observação foi mais acentuada na dose de 1 μ g/g, sendo esta a dose escolhida para o nosso estudo (SILVEIRA et al, 2004).

No sentido de verificar se havia algum tipo de transformação neoplásica, foi necessário testar um protocolo em modelo animal com avaliação histopatológica e imuno-histoquímica para a caracterização das alterações morfológicas crônicas induzidas pelo veneno de *B.jararaca*.

4 OBJETIVOS

Induzir lesões cutâneas, em camundongos, pela injeção do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

Reproduzir, em camundongos, as alterações da resposta tecidual já descritas em lesões crônicas de humanos causadas pelo veneno de *Bothrops jararaca*.

Descrever as alterações morfológicas cutâneas (histopatológicas e imuno-histoquímicas), induzidas experimentalmente em camundongos, pelo veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* nos diferentes estágios evolutivos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Foram utilizados 32 camundongos adultos suíços albinos, do sexo masculino, divididos em 8 grupos de 4 camundongos, sendo um grupo controle, pesando entre 20 e 25 gramas. Durante todo o experimento receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ciclo de luz natural. A manipulação e os procedimentos com os animais obedeceram os princípios da CAUAP (Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa). O veneno bruto de *Bothrops jararaca* em uso foi obtido junto ao Instituto Vital Brazil (Niterói- Rio de Janeiro).

5.2 MÉTODOS- INDUÇÃO DA LESÃO

As lesões cutâneas foram induzidas no terço distal da cauda dos animais através da injeção intradérmica de 1,0 mg/Kg (1µg/g) do veneno. Utilizamos grupo controle no qual foi injetada solução salina. A dose escolhida foi retirada de observações anteriores realizadas no Laboratório de Toxinas Ofídicas, Departamento de Farmacologia Básica e Clínica da UFRJ (Melo et al, 1994; Calil-Elias et al, 2002). Após 24 horas, 72 horas, 7, 21, 30, 45 e 60 dias da injeção da peçonha ofídica, os animais (em grupos de 4 camundongos) foram anestesiados e sacrificados com éter etílico, para a remoção da cauda em sua porção proximal.

Os fragmentos de tecido para o estudo histopatológico foram fixados em formaldeído tamponado a 4% e, em seguida, submetidos à imersão em EDTA para a descalcificação do seu eixo central ósseo. Seguiu-se a desidratação e inclusão em parafina (HISTOSEC-Merck®). Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos e corados com a técnica de Hematoxilina-eosina.

O material removido antes da injeção do veneno de serpente e a partir do 7^o dia da injeção foram reservados para o estudo imuno-histoquímico.

5.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram realizados cortes histológicos de 4 micra de espessura, colocados em lâminas previamente microfilmadas com Poly-L-Lysina [(hidrochloride) Sigma Company] ou SILANO [(3- aminopropyltriethoxy) Sigma Company], que após serem desparafinizados e hidratados em três banhos de xilol durante 3 minutos e três banhos de álcool durante 3 minutos, foram lavados em água corrente e água destilada. A peroxidase endógena foi inibida com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 a 3% meio a meio em metanol, três banhos sucessivos de 10 minutos), lavados em solução salina tamponada (PBS). Para a recuperação antigênica foi realizado banho de tampão citrato, pH 6.0, em panela a vapor, na temperatura de 98°C durante 40 minutos, seguido de resfriamento em temperatura ambiente. Após lavagem em água corrente e água destilada, realizado banho de albumina bovina a 1% (BSA) durante 30 minutos. Após escorrida a albumina, a região em torno do corte foi secada e, então, aplicado o soro primário durante o pernoite. Seguiram-se três lavagens sucessivas em tampão Tris-HCl por 3 minutos. A incubação com soro secundário durou 20 minutos, seguida de mais três banhos sucessivos com tampão Tris-HCl por 3 minutos. Após este tempo, seguiram-se os passos normais do método do complexo ABC (avidina-biotina)- aplicação do soro strept-avidina-biotina por 30 minutos. Nova lavagem tripla com tampão tris-HCl por 3 minutos, seguindo-se a revelação com DAB (diamino benzidino), com controle de cada lâmina através de microscopia óptica. Após lavagem com água corrente e água destilada, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer durante 2 minutos e lavados em água corrente por 5 minutos. Finalmente foram hidratados, clarificados e a seguir montados em bálsamo.

Resultado: é considerado positivo o aparecimento de coloração acastanhada nos locais de acoplamento antígeno-anticorpo.

5.4 ANTICORPOS EMPREGADOS

Os anticorpos utilizados, suas especificidades, diluições empregadas e fontes comerciais estão listadas na tabela 1. Todos os anticorpos são monoclonais.

5.5 CONTROLES

A pele peri-lesional e pele normal dos camundongos serviram como controle interno positivo para os anticorpos. Omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo.

Tabela 1- Anticorpos monoclonais empregados

ANTICORPOS	CLONE	FONTE	DILUIÇÃO	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
CK 10,14,16,19	AE1	DAKO	1:100	MOLL et al, 1982
CK10	DEK-10	DAKO	1:100	IVANY et al, 1989
CK14	LL002	NOVOCASTRA	1:100	PURKIS et al, 1990
CK16		SEROTEC	1:20	*
CD34	QBEND10	DAKO	1:50	CIVIN et al, 1989
S100	COW-S100	DAKO	1:100	MOORE BW, 1965
FXIIIa	Human placenta	CALBIOCHEN	1:1000	*

(*) Não existem publicações exclusivas na literatura

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE CLÍNICO-PATOLÓGICA

Análise antes da injeção do veneno

Todos os animais exibiam cauda totalmente recoberta por pele pardo-clara e pilosa, medindo entre 6.5 e 7.5 cm de comprimento e com espessuras variando entre 4.0 mm e 1.0 mm em suas extremidades distal e proximal, respectivamente. Ao exame microscópico, observou-se epiderme e derme sem alterações, apresentando arquitetura similar à pele humana, com destaque à presença marcante de anexos na derme.

24 horas após a injeção do veneno

Após 24 horas da injeção intradérmica da toxina ofídica, a cauda de todos os animais, 32/32 (100%), apresentaram edema eritêmato-violáceo intenso com áreas de equimose. Observou-se aumento da espessura da cauda, que variou em 2.0 a 3.0 mm. O exame microscópico revelou infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares (PMNs), focos hemorrágicos e proeminente edema na derme. Destacou-se a presença de fendas dermo-epidérmicas.

72 horas após a injeção do veneno

Em todos os animais, 32/32 (100%), persistiram o edema e o eritema violáceo e surgiram bolhas de conteúdo hemorrágico ao lado de erosões. À microscopia, observou-se hiperqueratose, moderada hiperplasia epitelial, presença de algumas células acantolíticas e hemácias na área de clivagem subepidérmica. Infiltrado inflamatório moderado, composto por PMN e mononucleares (MNs).

7º dia pós-injeção do veneno

Após sete dias da injeção, observou-se redução parcial do edema, com regressão da espessura da cauda em aproximadamente 1.0 mm em 4/4 (100%) animais, ainda sendo possível identificar áreas de equimose em 3/4 (75%)

animais, com necrose do terço distal da cauda em 2/4 (50%) dos animais. O exame microscópico revelou em 2/4 (50%) animais necrose extensa, com presença de células-fantasma na epiderme e anexos. Hiperplasia das camadas mais inferiores da epiderme já era observada em áreas não afetadas pela necrose. Em todos os animais, 4/4 (100%), congestão vascular na derme, com edema e infiltrado inflamatório difuso de PMN e MN.

21º dia pós-injeção do veneno

Após 21 dias da injeção, 2/4 (50%) animais tiveram eliminação de parte da cauda, correspondente à área necrosada, persistindo no local coto violáceo, sendo que em apenas um destes animais notou-se a não cicatrização das erosões, que evoluíram para exulceração no segmento distal do coto. Os demais animais, 3 dos 4 (75%), já exibiam cicatrização parcial de suas caudas, com reepitelização das lesões e crostas hemáticas. Na microscopia evidenciou-se acantose, perda da polaridade e atipia nuclear nas camadas mais profundas da epiderme, com extensão das alterações para os folículos.

30º dia pós-injeção do veneno

Em apenas um (25%) animal observou-se espessamento do coto da cauda, ainda com eritema violáceo, descamação e ausência de pêlos, sendo centrada por corno cutâneo que evoluiu com queda após a sua manipulação. O exame microscópico correspondeu a paraceratose, perda da polaridade e leve atipia nuclear em toda a espessura da epiderme. Destacou-se, ainda, extensa hemorragia na derme.

Os demais animais, 3/4 (75%), apresentaram cicatrização completa das lesões e ausência de pêlos. Em 2/4 (50%) observou-se, sobre a área reepitelizada, a formação de um novo vaso permanente na região dorsal da cauda. Ao exame microscópico, acantose, com áreas de hiperplasia pseudo-epiteliomatosa, perda da polaridade na camada basal, fibrose na derme e ausência de anexos na região afetada. Nos camundongos em que se observou formação de vaso dorsal, foi identificada angiogênese, com acentuada congestão no plano subdérmico e aspecto de ramificação arborescente permeando

focalmente a derme, em relação com a área cicatricial (desaparecimento de estruturas anexiais com substituição por proliferação fibrosa).

45° dia pós-injeção do veneno

Todos os animais, 4/4 (100%), apresentavam cicatrização completa no 45° dia após a indução da lesão e em 2/4 (50%) animais notou-se delgado vaso sobre a cicatriz. Não foi observada a repilação da área cicatrizada. O exame microscópico revelou, sobre a área correspondente à lesão aguda, região cicatricial, com leve hiperplasia da epiderme, proliferação fibrosa, ausência de anexos e ectasia vascular na derme. Em apenas um camundongo não foi observada a hiperplasia vascular.

60° dia pós-injeção do veneno

Após dois meses da injeção da toxina, todos os animais apresentavam plena recuperação do quadro, repilação completa da cauda em 2/4 (50%) casos e parcial em 2/4 (50%), permanecendo a formação vascular sobre o terço distal remanescente da cauda em 3 (75%) dos 4 animais. A microscopia revelou hiperplasia das camadas mais inferiores da epiderme, proliferação fibrosa na derme e ausência de anexos em 2/4 casos. Os outros 2 (50%) não se observou cicatriz, sendo notada a presença de anexos.

6.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Análise antes da injeção do veneno

O anticorpo AE1 (CKs 10, 14, 16 e 19) exibiu positividade em epítomos das camadas basal e suprabasal da epiderme. Na epiderme, o anticorpo LL002 (CK14) marcou a camada basal e glândulas sebáceas. A CK10 exibiu imunorreatividade em todas as camadas suprabasais da epiderme, células positivas também foram detectadas nos folículos pilosos, glândulas sebáceas e ductos excretórios das glândulas sudoríparas. A proteína S-100 reagiu com algumas células da camada basal e das camadas superiores. O CD34 apresentou pouca positividade na derme, relacionando-se a vasos sanguíneos. Não foi observada imunorreatividade para a CK16 e para o fator XIIIa.

O padrão de imunorreatividade encontrado com os diferentes anticorpos foi semelhante ao descrito na literatura médica (ELGJO et al, 1976; DALE et al, 1976; SCHLEGEL, 1982; ROOP et al, 1983; CAULÍN et al, 1993; MING et al, 1994; TROY & TURKSEN, 1999; MOMMERS et al, 2000; ROSSUM et al, 2000).

Tabela 2 - Padrões de expressão dos anticorpos na pele normal do camundongo

Animais anticorpos	A	B	C	D
AE1	+ ^a	+ ^a	+ ^b	+ ^b
CK10	+ ^c	+ ^c	+ ^c	+ ^c
CK14	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
CK16	-	-	-	-
CD34	+ ^d	-	-	+ ^d
S100	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^b
FXIIIa	-	-	-	-

(-) Negatividade

(+) Positividade: a- basal
 b- basal; parabasal eventual
 c- suprabasal
 d- células dérmicas, relacionadas a vasos sanguíneos

7º dia pós-injeção do veneno

Foram estudados 4 camundongos e 3 deles exibiram imunorreatividade para o anticorpo AE1 (CKs 10, 14, 16, 19) em todas as camadas da epiderme, sendo em dois casos imunorreatividade mais significativa na camada basal. No quarto caso, em decorrência da necrose epidérmica extensa, não houve epitélio preservado para a marcação. O anticorpo CD34 mostrou marcação positiva em apenas um caso, na derme, sobre vasos, em região de hiperplasia vascular. Todos os 4 casos exibiram marcação positiva para a proteína S-100, com distribuição em células dérmicas, correspondendo à região do infiltrado inflamatório. Na epiderme, discreta marcação nas camadas basal e superficiais, com parca evidência de processos dendríticos. A CK10 foi negativa em apenas um caso, prejudicado pela inviabilidade do tecido necrosado. Nos demais, 3/4 casos, houve marcação apenas das porções mais superficiais da epiderme e livres de hiperplasia. Foi observada a positividade epidérmica com a CK16, na camada basal. Na região correspondente à hiperplasia epidérmica destacou-se um mosaico de células positivas, fracamente positivas e negativas. Negatividade sobre a epiderme necrosada. Não houve imunorreatividade para o fator XIIIa e para a CK14 em nossa amostra.

Tabela 3 - Padrões de expressão dos anticorpos após 7 dias da injeção do veneno de serpente

Animais anticorpos	A	B	C	D
AE1	+ ^a	+ ^a	+ ^b	-
CK10	+ ^c	+ ^c	+ ^c	-
CK14	-	-	-	-
CK16	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d
CD34	+ ^e	-	-	-
S100	+ ^f	+ ^f	+ ^f	+ ^f
FXIIIa	-	-	-	-

(-) Negatividade

(+) Positividade: a- basal; parabasal eventual
 b- uniforme em toda a espessura epidérmica
 c- epiderme superficial, livre de hiperplasia
 d- epiderme hiperplasiada
 e- células dérmicas, relacionadas a hemácias e endotélio
 f - células dérmicas, relacionadas ao infiltrado inflamatório

21º dia pós-injeção do veneno

Os padrões de marcação observados com o clone AE1(CKs 10, 14, 16, 19) foram variados. No camundongo A, 1/4, houve perda da marcação da basal, com fraca positividade suprabasal. O camundongo B, marcação uniforme, em toda a espessura da epiderme. Fraca positividade da basal no camundongo C e um quarto caso com ausência de imunorreatividade. O anticorpo CD34 mostrou marcação positiva em todos os animais, 4/4, com imunorreatividade de hemácias e endotélio. Dos 4 camundongos, 3 exibiram marcação positiva para a proteína S-100, com distribuição perivascular, na derme, relacionadas à região de infiltrado inflamatório, porém com grau variável de intensidade (dois animais com imunorreatividade proeminente). Um quarto caso teve sua avaliação prejudicada por problemas técnicos. A CK10 foi positiva em todos os animais, 4/4, com marcação apenas das porções mais superficiais da epiderme, sendo negativas nas camadas mais profundas e nas áreas hiperplasiadas, com perda da polaridade. Destaca-se um padrão de faixas na marcação da CK10, com sua imunorreatividade sendo observada em faixas descontínuas ao longo da epiderme. Foi observada a positividade epidérmica para a CK16, em todos os animais estudados, permanecendo o aspecto já descrito em mosaico sobre região do epitélio regenerado (hiperplasiado). Houve imunorreatividade para o fator XIIIa somente com o tecido adiposo. A CK 14 mostrou imunorreatividade em nossa amostra somente em glândulas sebáceas.

Tabela 4 - Padrão de expressão dos anticorpos 21 dias após a injeção do veneno de serpente

Animais anticorpos	A	B	C	D
AE1	+ ^b	+ ^c	+ ^a	-
CK10	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d
CK14	+ ^h	+ ^h	+ ^h	+ ^h
CK16	+ ^e	+ ^e	+ ^e	+ ^e
CD34	+ ^f	+ ^f	+ ^f	+ ^f
S100	+ ^g	+ ^g	+ ^g	-
FXIIIa	+ ⁱ	+ ⁱ	+ ⁱ	+ ⁱ

(-) Negatividade

(+) Positividade:

a- basal

b- suprabasal

c- uniforme em toda a espessura epidérmica

d- epiderme superficial, livre de hiperplasia

e- epiderme hiperplasiada

f- células dérmicas, relacionadas a hiperplasia vascular

g- células dérmicas, relacionadas ao infiltrado inflamatório

h- glândulas sebáceas

i- tecido adiposo

30º dia pós-injeção do veneno

O clone AE1 (CKs 10, 14, 16, 19) apresentou imunorreatividade em todas as camadas da epiderme em 3/4 animais estudados. No quarto camundongo observou-se positividade leve ou ausente nas camadas hiperplasiadas. Em todos os animais, o anticorpo CD34 mostrou imunomarcção dérmica em uma proporção que variou entre 50 e 60% das células na área de proliferação cicatricial, em correspondência à angiogênese pronunciada. Todos os 4 animais exibiram marcação para a proteína S-100, com distribuição em 10 a 20% da população celular dérmica, não se observando marcação significativa na epiderme. A CK10 manteve seu padrão de marcação em faixas, com positividade nas porções mais superficiais e negatividade basal e de áreas hiperplasiadas. Novamente foi observado um mosaico (células positivas, fracamente positivas e negativas) com a CK16 na região de epitélio regenerado. A análise do fator XIIIa revelou ausência de imunomarcção na área de proliferação fibrosa, com positividade apenas no tecido subcutâneo. Em apenas um dos 4 animais avaliados foi possível detectar positividade para a CK14 nas camadas mais superficiais da epiderme.

Tabela 5 - Padrão de expressão dos anticorpos após 30 dias da injeção do veneno de serpente

Animais anticorpos	A	B	C	D
AE1	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^c
CK10	+ ^c	+ ^c	+ ^c	+ ^c
CK14	-	+ ^a	-	-
CK16	+ ^d	+ ^d	+ ^d	+ ^d
CD34	+ ^e	+ ^e	+ ^e	+ ^e
S100	+ ^f	+ ^f	+ ^f	+ ^f
FXIIIa	+ ^g	+ ^g	+ ^g	+ ^g

(-) Negatividade

(+) Positividade:

a- suprabasal

b- uniforme em toda a espessura epidérmica

c- epiderme superficial, livre de hiperplasia

d- epiderme hiperplasiada

e- células dérmicas, relacionadas a hiperplasia vascular

f- células dérmicas, relacionadas ao infiltrado inflamatório

g- tecido adiposo

45° dia pós-injeção do veneno

Dos 4 camundongos avaliados, 2 exibiram imunorreatividade para AE1(CKs 10,14,16, 19), com marcação em todas as camadas da epiderme. Nos outros 2 animais não houve marcação devido a problemas com a técnica. O anticorpo CD34 mostrou positividade em hemácias e endotélio na região de ectasia vascular da derme. Todos os 4 animais exibiram marcação para a proteína S-100, com distribuição em 10 a 20% da população celular dérmica, observando-se marcação também em algumas células na epiderme, localizadas na camada basal. A CK10 manteve seu padrão de marcação em faixas, com positividade suprabasal. Também foi observado um mosaico (células positivas, fracamente positivas e negativas) com a CK16 na região hiperplasiada do epitélio em 2/4 animais. Nos 4 camundongos foi observada positividade em glândulas sebáceas para a CK14, sem expressão na epiderme. O fator XIIIa reagiu somente com o tecido adiposo em todas as amostras.

Tabela 6 - Padrão de expressão dos anticorpos após 45 dias da injeção do veneno de serpente

Animais	A	B	C	D
Anticorpos				
AE1	+ ^b	+ ^b	-	-
CK10	+ ^c	+ ^c	+ ^c	+ ^c
CK14	+ ^g	+ ^g	+ ^g	+ ^g
CK16	+ ^d	+ ^d	-	-
CD34	+ ^e	+ ^e	+ ^e	+ ^e
S100	+ ^{f, a}	+ ^{f, a}	+ ^{f, a}	+ ^{f, a}
FXIIIa	+ ^h	+ ^h	+ ^h	+ ^h

(-) Negatividade

(+) Positividade:

- a- basal
- b- uniforme em toda a espessura epidérmica
- c- epiderme superficial, livre de hiperplasia
- d- epiderme hiperplasiada
- e- células dérmicas, relacionadas a hiperplasia vascular
- f- células dérmicas, relacionadas ao infiltrado inflamatório
- g- glândulas sebáceas
- h- tecido adiposo

60º dia pós-injeção do veneno

Todos as 4 amostras revelaram positividade para o anticorpo AE1 (CKs 10, 14, 16, 19), sendo a imunorreatividade mais significativa na camada basal hiperplasiada. O anticorpo CD34 mostrou marcação positivada em 2/4 amostras, em células marcadas na derme, junto à região de proliferação fibrosa. Em 2 casos, problemas técnicos inviabilizaram a avaliação. Das 4 amostras, 3 exibiram marcação positiva para a proteína S-100, com distribuição nas células dérmicas, correspondendo à região de proliferação fibrosa, em uma proporção de 10 a 20 % das células. Marcação salteada foi observada na camada basal. A CK10 manteve seu padrão em faixas e de distribuição suprabasal, não envolvendo as regiões de hiperplasia epidérmica. A CK 16 apresentou padrão variável na marcação. Mosaico, com predomínio de células não marcadas, em 2/ 4 animais. Em outro houve imunorreatividade uniforme em toda a espessura da epiderme. No quarto camundongo não foi possível a avaliação em decorrência de problemas técnicos. A CK 14 exibiu marcação em um dos animais, com reatividade na camada basal. Nos outros 3 casos, apenas imunomarcação de glândulas sebáceas. A expressão do fator XIIIa foi observada somente no tecido adiposo.

Tabela 7 - Padrão de expressão dos anticorpos após 60 dias da injeção do veneno de serpente

Animais anticorpos	A	B	C	D
AE1	+ ^b	+ ^b	+ ^b	+ ^b
CK10	+ ^d	+ ^d	-	-
CK14	+ ^g	+ ^a	+ ^g	+ ^g
CK16	+ ^e	+ ^e	-	+ ^c
CD34	-	+ ^f	-	+ ^f
S100	+ ^f	-	+ ^f	+ ^f
FXIIIa	+ ^h	+ ^h	+ ^h	+ ^h

(-) Negatividade

(+) Positividade:

- a- basal
- b- basal; parabasal eventual
- c- uniforme em toda a espessura epidérmica
- d- epiderme superficial, livre de hiperplasia
- e- epiderme hiperplasiada
- f- células dérmicas, relacionadas a proliferação fibrosa
- g- glândulas sebáceas
- h- tecido adiposo

7 DOCUMENTAÇÃO FOTOMICROGRÁFICA

Foto 1: Fotografia da pele da cauda do camundongo antes da injeção do veneno de serpente.

Foto 2: Fotografia da pele da cauda do camundongo 21 dias após a injeção do veneno de serpente. Necrose do terço dista da cauda.

Foto 3: Foto da dermatoscopia da pele da cauda do camundongo antes da injeção do veneno de serpente.

Foto 4: Foto da dermatoscopia da pele da cauda do camundongo 30 dias após a injeção do veneno de serpente. Formação vascular na região dorsal da cauda, correspondente à área reepitelizada.

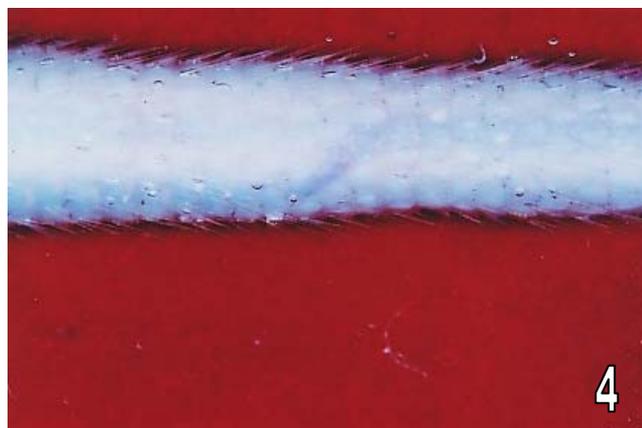
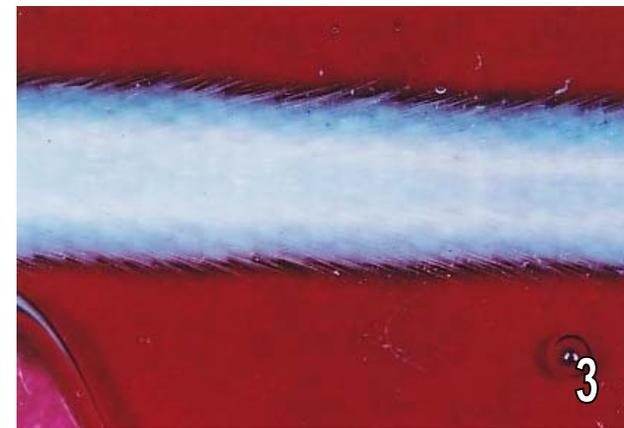
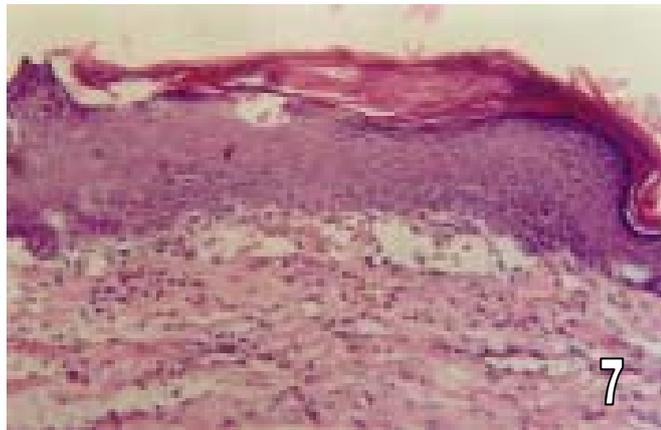
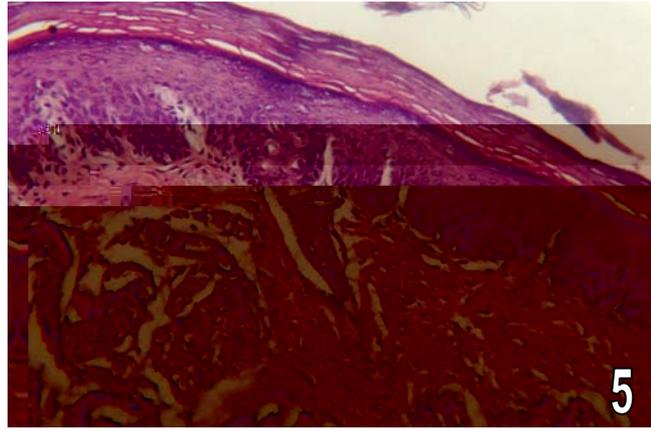


Foto 5: Microfotografia da pele do camundongo antes da injeção do veneno de serpente. Epiderme e derme sem alterações, apresentando arquitetura semelhante à da pele humana, destacando-se a presença de anexos na derme. HE; X 100.

Foto 6: 24 horas após a injeção de veneno. Infiltrado leucocitário com predomínio de PMNs, discreta hemorragia e proeminente edema na derme. Presença de fenda dermo-epidérmica. HE; X 100.

Foto 7: 72 horas após a injeção do veneno. Hiperkeratose, moderada hiperplasia epitelial, algumas hemácias e células acantolíticas na área de clivagem subepidérmica. Moderado infiltrado leucocitário na derme. HE; X 100

Foto 08: 7 dias após a injeção do veneno. Necrose extensa da epiderme, com presença de células-fantasma. HE; X 100.



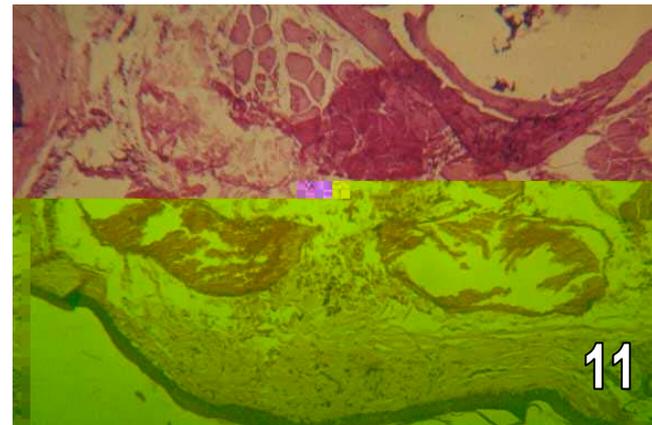
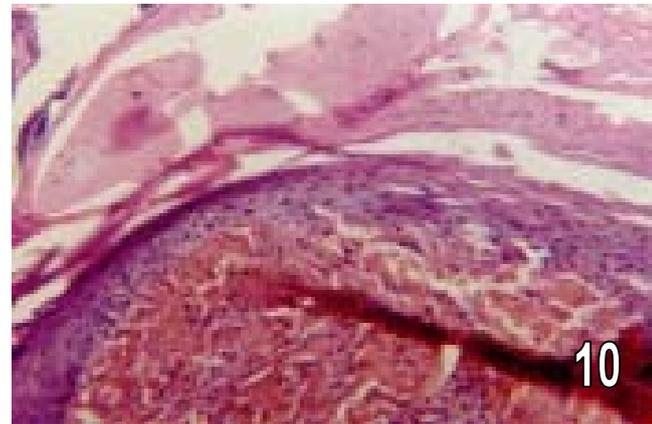
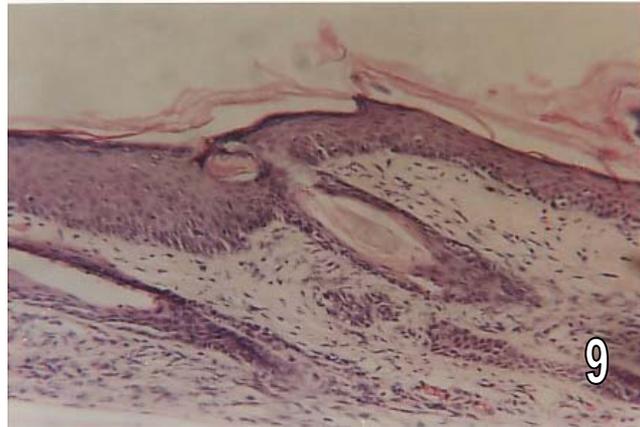
2



Foto 09: 21 dias após a injeção do veneno. Acanthose, perda da polaridade e atipia nuclear nas camadas mais profundas da epiderme, com extensão das alterações para os folículos. HE; X 100.

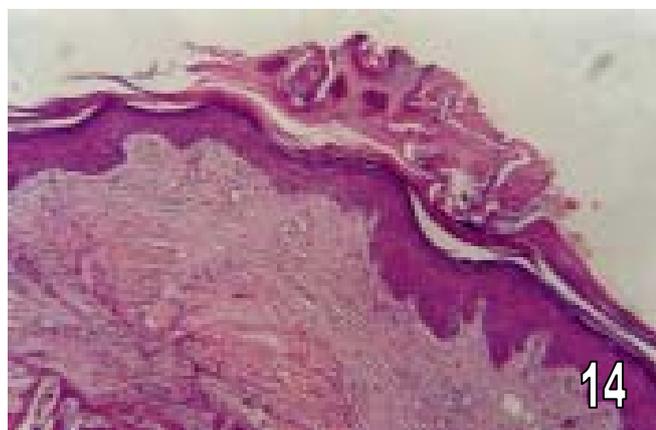
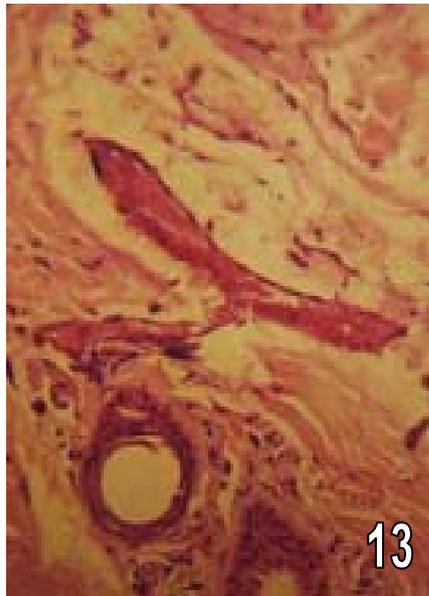
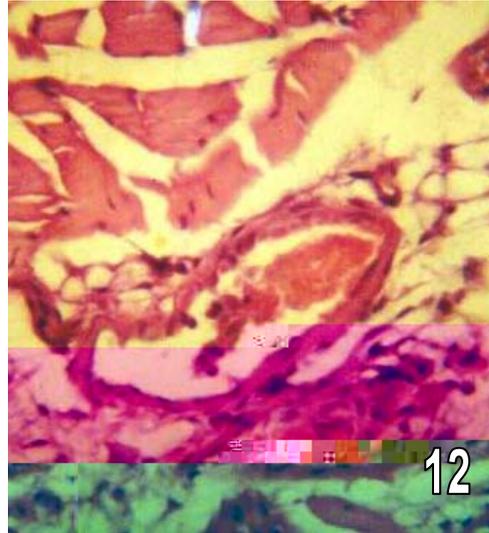
Foto 10: 30º dia pós-injeção do veneno. Paraceratose, perda da polaridade e leve atipia nuclear em toda a espessura da epiderme. Na derme, destaca-se extensa hemorragia.

Foto 11: 30º dia após a injeção de veneno. Angiogênese, com acentuada congestão no plano subdérmico, em relação com a área cicatricial. HE; X 100.



Fotos 12 e 13: 30º dia após a injeção de veneno. Aspecto de ramificação arborescente permeando focalmente a derme. HE; X 200 e X400.

Foto 14: 45º dia após a injeção de veneno. Observa-se sobre a área correspondente à lesão aguda, região cicatricial, com leve hiperplasia da epiderme, proliferação fibrosa e ausência de anexos. HE; X 200.



Fotos 15 e 16: CK 10. Marcação apenas das porções mais superficiais da epiderme, sendo negativas nas camadas mais profundas e nas áreas hiperplasiadas, com perda da polaridade, 21 e 30 dias após a injeção do veneno, respectivamente. X200 e X 100.

Fotos 17 e 18: CK16. 21º e 30 º dias após a injeção do veneno, respectivamente. Positividade epidérmica com a CK16 na região correspondente ao epitélio regenerado e hiperplasiado, destacando-se um mosaico de células positivas, fracamente positivas e negativas. X 100.

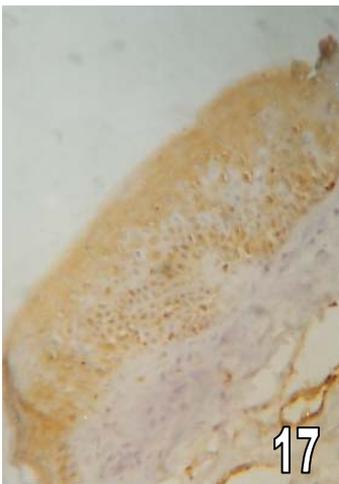
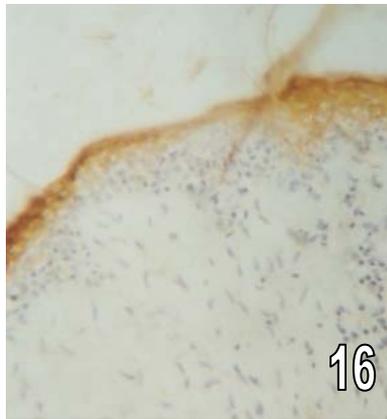
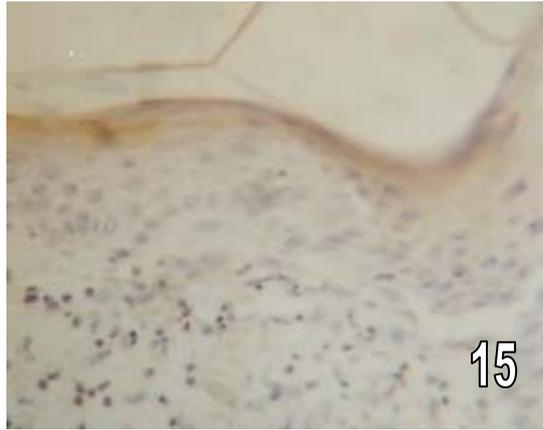
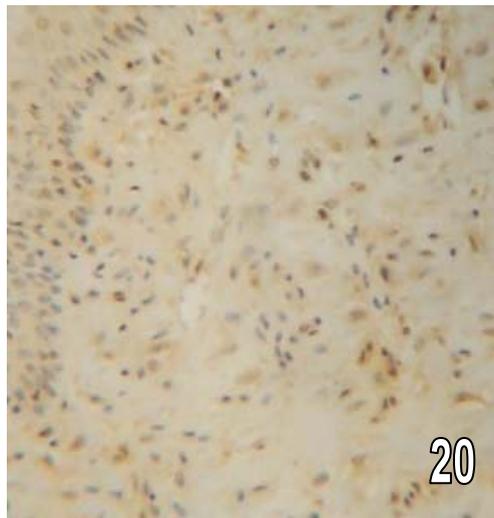
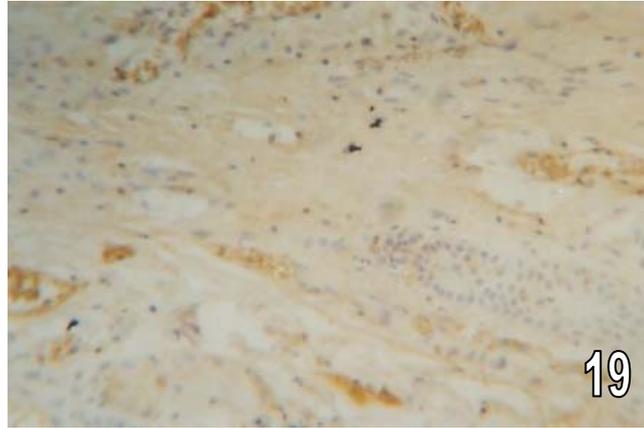


Foto 19: CD34. 30º dia após a injeção do veneno. O anticorpo CD34 mostra imunorreatividade de hemácias e endotélio.

Foto 20: CD34. 45º dia após a injeção do veneno. Em área de proliferação fibrosa, proeminente imunorreatividade de células endoteliais.



8 DISCUSSÃO

O dano tecidual local, isto é, hemorragia, mionecrose, dermonecrose, bolhas e edema constituem as conseqüências mais graves e comuns no envenenamento pelos viperídeos (GUTIÉRREZ et al, 1998). A patogênese destas alterações é extremamente complexa, uma vez que são induzidas pela ação combinada de diferentes toxinas presentes nos venenos, tais como proteases, fatores hemorrágicos, metaloproteinases, fosfolipases e mediadores endógenos (GUTIÉRREZ et al, 1980, CARNEIRO et al, 2002). A reação local subsequente à penetração do veneno leva ao estabelecimento de lesões que podem estar relacionadas aos componentes do veneno e/ou à produção de mediadores do hospedeiro, envolvidos no recrutamento local de populações celulares específicas e ativação ou dano de células endoteliais no sítio do infiltrado inflamatório (CARNEIRO et al, 2002; KAWANO et al, 2002).

Alguns estudos já demonstraram que linhagens de camundongos isogênicos apresentam graus distintos de suscetibilidade aos efeitos sistêmicos de venenos de serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Loxosceles* e *Bothrops*, confirmando a influência genética na resposta aguda ao envenenamento (BARROS et al, 1998; STERN et al, 2002). CARNEIRO et al (2002) demonstraram que camundongos geneticamente selecionados para uma resposta inflamatória mais ou menos intensa são igualmente suscetíveis à letalidade veneno induzida, mas diferem significativamente na resposta local ao veneno de *Bothrops jararaca*, quando são avaliados parâmetros como extravasamento local

de hemácias, edema do coxim plantar, número de polimorfonucleares localmente infiltrados, produção de fatores de necrose tumoral, interleucinas e prostaglandinas.

Em nossos experimentos conseguimos reproduzir os sinais de dano tecidual local agudo descritos na literatura. Nas 72 horas iniciais, após o envenenamento, evidenciamos resposta aguda demonstrada pelos achados clínicos e histopatológicos, de maneira semelhante em todos os animais.

Os casos de envenenamento por serpentes constituem emergência médica em muitos lugares do mundo. Além dos efeitos locais, conduzem com freqüência a situações graves de hemorragia, choque cardiovascular, falência renal aguda, coagulopatias e morte (RUCAVADO et al, 2000). Os anti-venenos (soro anti-ofídico) são altamente eficazes na neutralização das alterações sistêmicas da mordedura por serpentes. Contudo, a neutralização dos efeitos locais é dificultada, diante da velocidade com que se desenvolve o dano tissular e do tempo decorrido do acidente até a chegada da vítima a um centro de saúde onde haja soroterapia disponível. Como conseqüência, seqüelas permanentes se desenvolvem em um número de pacientes (RUCAVADO et al, 2000). Por isso a urgência em se encontrar terapias complementares na neutralização do dano tissular, explicando a escassez de estudos na fase crônica, sendo os trabalhos experimentais com camundongos e toxina ofídica representados basicamente pela fase aguda do envenenamento.

Após 7 dias da injeção local do veneno começamos a observar variabilidade na intensidade das reações. Em todos os casos houve redução progressiva do edema e do infiltrado inflamatório, que passou a ser predominantemente representado por mononucleares. Em metade dos

camundongos observou-se necrose extensa, comprometendo inclusive os anexos. Todos os animais seguiram invariavelmente para a cicatrização, com reepitelização das áreas necróticas, num período que variou de 7 a 21 dias. No 21º dia, apenas um animal apresentava, ainda, exulceração do coto da cauda. A partir do 30º dia, evidenciou-se a proliferação fibrosa da derme e a recuperação parcial dos anexos- metade dos animais apresentou repilação parcial e a outra metade não mostrou repilação da área lesada.

A resposta biológica à injúria em organismos superiores recai em duas categorias: regeneração e reparação. Regeneração é a substituição completa e restauração da massa tissular adulta com função e arquitetura normais. Reparação envolve a migração de fibroblastos ao sítio da ferida, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno em padrão desorganizado, com formação de tecido cicatricial. CLARCK et al (1998), ressaltaram a habilidade limitada para a regeneração nos mamíferos, principalmente se comparada à dos anfíbios, onde membros inteiros podem ser regenerados após amputação. Em seus estudos destaca a elevada capacidade de reparação dos camundongos, arquétipo de resposta à injúria nos mamíferos.

Após a cicatrização completa das lesões da fase aguda, metade dos animais apresentou, sobre a área reepitelizada, a formação de novo vaso, que à microscopia traduziu-se em angiogênese, com acentuada congestão no plano subdérmico. A angiogênese, brotamento de vasos a partir de vasos preexistentes, é considerada condição fundamental para a reprodução, desenvolvimento e reparo dos tecidos. Todos estes processos dependem do controle equilibrado do crescimento dos vasos sanguíneos, de maneira que possam ser ativados ou inativados em curto período de tempo (FOLKMAN, 1995a). Estados patológicos,

como a retinopatia diabética, artrite reumatóide e doença neoplásica, são condições angiogênese-dependentes. Já a terapia pró-angiogênica é a expectativa para o tratamento de doenças isquêmicas, como a oclusão aterosclerótica dos membros inferiores, angina pectoris/infarto agudo do miocárdio.

Estudos com animais indicam que fatores angiogênicos desempenham papel fundamental na cicatrização de ulcerações do trato gastrointestinal. FOLKMAN et al, 1991, demonstraram a deficiência microvascular no leito de úlceras pépticas em roedores. A administração de fatores indutores da angiogênese acelerou a cicatrização das lesões ulceradas nesses animais, fato que estimulou o desenvolvimento de estudos clínicos (ERNST et al, 2001; MIZUKI et al, 2004). No outro pólo, visando a terapêutica anti-angiogênica, encontramos condições patológicas como os hemangiomas irresponsivos à corticoterapia, ou aqueles localizados em órgãos vitais, causadores de obstrução de via aéreas ou falência cardíaca pela elevação do seu débito (FOLKMAN, 1995b).

Apesar da escassez de estudos experimentais na fase de cicatrização e reparo de feridas pós-empeçonhamento, são bem conhecidos os mecanismos envolvidos no reparo da pele. O VEGF, fator angiogênico endógeno, considerado um dos principais mitógenos endoteliais e indutores de permeabilidade dos vasos, atuantes na etapa de proliferação vascular e fibroblástica da cicatrização, encontra sua forma similar no veneno das serpentes. O VEGF mantém a sua capacidade de induzir a proliferação endotelial *in vitro*, mesmo quando ligado ao fibrinogênio solúvel no meio e à superfície do fibrinogênio imobilizada ou à fibrina existente no coágulo, indicando a preservação de suas propriedades no sítio da injúria (SAHNI & FRANCIS, 2000).

A epiderme é um epitélio estratificado consistindo principalmente de queratinócitos pós-mitóticos, proliferantes e diferenciados (WATT & HOGAN, 2000). Estes queratinócitos derivam de células originadas de células tronco que representam um número restrito de queratinócitos basais, possivelmente residindo na região do bulge do folículo piloso (REICHELT & MAGIN, 2002). O estado de diferenciação dos queratinócitos epidérmicos é um reflexo do intrincado padrão de expressão de citoqueratinas (MOLL et al, 1982). O significado funcional da mudança de expressão das citoqueratinas ao perderem o contato com a zona da membrana basal em direção ao compartimento supra-basal ainda não está completamente entendido. Dado que as citoqueratinas são primariamente consideradas como proteínas do citoesqueleto, alterações em sua expressão têm sido identificadas como resultado da diferenciação, mas não como influenciadora do estado de diferenciação celular ou tissular (REICHELT & MAGIN, 2002).

Em nosso estudo, o padrão de expressão da CK 10 mostrou predomínio da região suprabasal. A epiderme lesional, embora ainda associada com diferenciação estratificada, apresentou compartimento de hiperplasia de células basalóides pobremente marcadas ou negativas, possivelmente com retardo de sua trilha de diferenciação terminal, associada ao estado de reparação. As áreas hiperplasiadas mostraram-se permanentemente negativas para a CK 10 durante toda a evolução do reparo da lesão.

A redução da expressão da CK10 durante a cicatrização de feridas, com a substituição pelas CKs 6 e 16 nos queratinócitos ativados, foi a primeira evidência de que a presença da CK10 não era compatível com estados de migração e proliferação celular. Nesta mesma linha, considerável número de publicações já demonstrou a ausência da CK10 em carcinomas de humanos e

camundongos (WINTER et al, 1983; ROOP et al, 1988). REICHELT & MAGIN, 2002, demonstraram que camundongos transgênicos com deleção da CK 10 são completamente viáveis e exibem pele intacta, resistente a *stress* mecânico devido à persistência compensatória no compartimento suprabasal das CKs 5 e 14, levando a considerável hiperproliferação dos queratinócitos basais. Estes resultados estabeleceram que a perda da CK10 estimula primariamente a proliferação de células basais. A CK10 parece, então, não ser apenas proteína do citoesqueleto, mas ter função adicional na regulação do ciclo celular, inibindo a sua proliferação. Em queratinócitos ativados, a perda ou redução da CK10 está acompanhada pelo aumento das chamadas CKs de reparação de ferida - CKs 6 e 16 (FREEDBERG et al, 2001) e pela elevação da oncoproteína c-Myc, envolvida na progressão do ciclo celular e oncogênese (PELENGARIS et al, 2000).

De relevância, também destacamos a expressão da CK16 em nossa amostra. Na pele normal do camundongo, antes da injeção, não houve expressão da CK16. Porém, em todos os casos de reepitelização e hiperplasia do epitélio, após a injeção do veneno, observamos a sua imunorreatividade. Este achado está provavelmente relacionado ao estado hiperproliferativo dos queratinócitos durante a reparação. O mesmo padrão já foi descrito em uma ampla variedade de processos patológicos e fisiológicos- psoríase, verruga vulgar, ceratose seborréica e cicatrização de feridas (REICHELT & MAGIN, 2002).

O clone AE1 apresentou padrão variável de expressão. Na pele normal, houve imunorreatividade em epítomos da camada basal e suprabasal. Após a injeção da toxina, observou-se o predomínio da marcação em toda a espessura da epiderme nos primeiros 7 a 21 dias. A partir do 30º dia a imunorreatividade envolveu principalmente a camada basal hiperplasiada. Esta expressão variável

do clone AE1 pode corresponder à sua capacidade de reconhecer determinantes antigênicos específicos nas camadas basal e suprabasal relacionadas às CKs ácidas 10, 14, 16 e 19.

No que diz respeito à citoqueratina 14, demonstradas pelo anticorpo LL002, não observamos o padrão de marcação restrito à camada basal visto na epiderme normal do camundongo. Após a injeção do veneno, houve imunorreatividade em 1 animal, no 30º dia, nas camadas mais superficiais da epiderme. Em outro animal, no 60º dia após a injeção, houve reatividade na camada basal. Em todos os outros animais a positividade foi observada apenas nas glândulas sebáceas.

O antígeno celular progenitor hematopoiético – CD34 exibiu marcação positiva após a injeção do veneno, na região dérmica, relacionada à proliferação fibrosa e hiperplasia vascular, confirmando os achados clínicos e histopatológicos de angiogênese.

Com o intuito de descrever mais detalhadamente a população celular dérmica que compunha a reação de reparo na pele dos animais, utilizamos a proteína S-100 e o fator XIIIa. A proteína S-100 mostrou imunorreatividade, com distribuição em células dérmicas, correspondendo à região perivascular, relacionada ao infiltrado inflamatório, porém com grau variável de intensidade, numa proporção que variou de 10 a 20% da população celular dérmica. Em 2004, RAVASI et al estudaram o genoma da família das proteínas S-100, analisaram sua estrutura e expressão em camundongos, ratos e humanos. Demonstrou-se elevado nível de conservação seqüencial nos mamíferos. Três novos membros da família S-100 foram descritos nas três espécies. Dois deles foram identificados em macrófagos ativados provenientes da medula óssea, indicando seu papel na inflamação. A avaliação estrutural e funcional das propriedades quimiotáticas

sugerem que a proteína humana S-100 é homóloga funcional da proteína murina. Estudos anteriores já destacaram a atuação da proteína S-100 como reguladora de processos celulares tais como crescimento, motilidade, ciclo celular e diferenciação. Atividades extracelulares, citoquina-símile, com efeitos parácrinos, na sobrevivência celular pós-injúria ou morte via apoptose, além da estimulação e inibição da atividade das células inflamatórias, também foram descritas (RIDINGER et al, 1998; HEIZMANN et al, 2002; KULSKI et al, 2003).

Não foi observada imunorreatividade na pele de nenhum dos nossos animais com o fator XIIIa, seja em área lesada ou sã.

O estado de promoção tumoral envolve a produção e a manutenção de um estado crônico de hiperplasia, proliferação celular e, finalmente, de expansão clonal seletiva das células. A principal característica de um agente promotor testado adequadamente é a sua habilidade em induzir hiperplasia após várias aplicações (DI GIOVANNI et al, 1994). Os efeitos de exposições individuais a promotores são reversíveis, sugerindo que alterações transitórias na epiderme são necessárias para promover o crescimento das células iniciadas (DLUGOZS & YUSPA, 1999). Os agentes promotores cutâneos são variados em estrutura e incluem estímulos físicos como ferimento e abrasão. Os agentes químicos, também promotores, alguns deles encontrados no ambiente humano como produtos naturais são considerados irritantes cutâneos (FUJIKI & SUGGIMURA, 1987; MANCUSO et al, 2004). Em nosso trabalho não reproduzimos a tumorigênese, mas identificamos a toxina ofídica como um possível agente promotor tumoral, uma vez que, experimentalmente, o veneno de *B. jararaca* induziu intensa resposta inflamatória local, com hiperplasia e alterações

citológicas displásicas transitórias na epiderme, evoluindo com padrão proliferativo de reparação de feridas.

Torna-se de maior importância a discussão das dificuldades de ordem técnica, pois revela ao leitor a complexidade da técnica imuno-histoquímica, que apresenta, até os dias de hoje, uma série de limitações. Neste trabalho selecionamos anticorpos monoclonais com reconhecida reatividade em tecido fixado em formol. A questão mais relevante, contudo, foi o fato de a cauda do camundongo abrigar eixo ósseo central. Dado o seu diminuto tamanho e necessidade de aproveitamento de toda a amostra, utilizou-se um descalcificador que possibilitasse a microtomia do material. Optamos pelo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), que apesar de causar menor agressão tecidual também pode interferir com a imunogenicidade, preservação e/ou apresentação de epítomos antigênicos, justificando ou contribuindo, desta forma, com a não marcação de alguns anticorpos empregados.

9 CONCLUSÕES

1. Reproduziram-se as lesões cutâneas pós-empeçonhamento, por meio da indução experimental com o veneno da serpente *Bothrops jararaca*, permitindo o acompanhamento de todas as etapas evolutivas, desde a fase aguda até a cicatrização.

2. Experimentalmente o veneno de *B. jararaca* induz intensa resposta inflamatória local com alterações transitórias na epiderme, que evolui com padrão proliferativo normal de reparação de feridas em mamíferos.

3. Identificaram-se hiperplasia e alterações citológicas displásicas transitórias na epiderme. Na derme foi observada cicatriz e angiogênese persistente até dois meses após a indução da lesão com o veneno.

4. A utilização de anticorpos monoclonais para citoqueratinas se mostrou útil na avaliação das alterações da diferenciação epidérmica nas lesões cutâneas de reparo.

5. O veneno de serpente é um possível agente promotor tumoral, ainda que neste trabalho a tumorigênese não tenha sido reproduzida.

6. Este é um modelo experimental de inflamação e reparo.

10 PERSPECTIVAS

Experimentos de carcinogênese em camundongos com deleção da CK10 podem revelar se há susceptibilidade aumentada ou não à tumorigênese cutânea nestes animais.

A reprodução de lesões cutâneas induzidas experimentalmente com a toxina ofídica utilizando-se camundongos submetidos à iniciação tumoral prévia poderá confirmar ou descartar a sua atuação como agente promotor tumoral.

A relação da angiogênese veneno-induzida, observada durante o reparo das feridas cutâneas dos roedores, com o VEGF-símile existente nos venenos de serpentes há de ser esclarecida em estudos específicos com este propósito.

O estudo combinado do veneno das serpentes e inibidores angiogênicos potentes *in vivo* pode ajudar a definir o surgimento ou não de uma nova ferramenta ou modelo para o estudo da patogênese e avanços terapêuticos, relacionados à angiogênese.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ACCIOLY-FILHO, J.W. Expressão das citoqueratinas nas lesões pré-malignas e maligna dos queratinócitos. 1995.144f. Dissertação (Mestrado em Dermatologia)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

ALDAZ, C.M. et al. Sequential development of aneuploidy, keratin modification and gamma-glutamyltransferase expression in mouse skin papillomas. Cancer Res 48: 3253-3257, 1988.

ALVES, A.F.A.; BACCHI, C.E.& VASSALO, J. Glossário dos principais marcadores imuno-histoquímicos. In: Manual de imuno-histoquímica. 1. ed. São Paulo. Sociedade Brasileira de patologia, 1999. V

ANDERSON, L.M. & RICE, J.M. Tumorigenesis in athymic nude mouse skin by chemical carcinogenesis and ultraviolet light. J Natl Cancer Inst 78: 125-134, 1987.

ANGULO, Y. et al. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase a2 from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. Arch Biochem Biophys 339: 260-266, 1997.

AZEVEDO, I.L.M.J. et al. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. J Biol Chem 43: 39836- 39844, 2001.

AZULAY R.D. & AZULAY D.R. Oncologia dermatológica. In: Dermatologia. 2. ed Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1992, Cap.15, p 222-267.

BAILLEUL, B. et al. Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. Cell 62: 697-7-8, 1990.

BALMAIN, A.; HARRIS,C.C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. Carcinogenesis 24: 1159-1165, 2003.

BALMAIN, A. et al. Functional loss of tumor suppressor genes in multistage chemical carcinogenesis, In: HARRIS, C.C.; HIROHASHI, S.; ITO, N.; PITOT, H.C.; SUGIMURA, T.; TERADA, M. & YOKOTA, J. Multistage carcinogenesis. Japan Scientific Society Press, Tokyo, 1992. p. 97-108.

BARON, J.M. et al. Modulation of P450 CYP3A4 dependent metabolism by p-glycoprotein: implications for P450 phenotyping. J Pharmacol Exp Ther 296: 351-358, 2001.

BARROS, S.F. et al. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. Mediators Inflamm 7: 339-346, 1998.

BERGERET, A. & NORMAND, J. C. Chemical induced cancers. Ver Prat 15; 50(4): 391-395, 2000.

BJARNASOSN, J.B. & FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmac Ther 62: 325-372, 1994.

BJARNASOSN, J.B. & TU, A. T. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. Biochemistry 17: 3395-3404, 1978.

BLOCH, B. Cancers and precancerous affections from the dermatological view point, In: FREEDBERG, M.F.; EISEN, A.Z. & WOLFF, K. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. New York: Nc Graw-Hill, 1999. p. 823.

BOWDEN, G.T. & KRIEG, P. Differential gene expression during multistage carcinogenesis. Environ Health Perspect 93: 51-56, 1991.

BROOKS, P.C.; CLARCK, R.A.F. & CHERESH, D.A.. Requirements of vascular integrin $\alpha\beta 3$ for angiogenesis. Science 264: 569-71, 1994.

BROWN, K. & BALMAIN, A. Transgenic mice and squamous multistage skin carcinogenesis. Cancer Metastasis Ver; 14(2): 113-124, 1995.

CALIL-ELIAS, S. et al. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. Braz J Med Biol Res 10: 1233-1235, 2002.

CAMEY, K.U.; VELARDE, D.T. & SANCHEZ, E.F. Pharmacological characterization and neutralization of the venom used in the production of bothropic antivenom in Brazil. Toxicon 40: 501-5019, 2002.

CARNEIRO, A. S. et al. Local inflammatory induced reaction by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. Toxicon 40: 1571-1579, 2002.

CAULÍN, C. et al. Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. Exp Cell Res 204: 11-21, 1993.

- CERIO, R.; GRIFFITHS, C.E. & COOPER, K.D. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. J Dermatol 121: 421-431, 1989.
- CHEN, Y. C. et al. Arsenic methylation and skin cancer risk in southwest Taiwan. Occup Environ Med 45(3):241-248, 2003.
- CHIPPAUX, J.P. Snake-bites: appraisal of the global situation. Bulletin OMS; 76: 515-524, 1998.
- CIVIN, C.I. et al. Report on the CD34 cluster workshop. In: KNAPP, W et al. Leucocyte typing IV white cell differentiation antigens. Oxford- New York- Tokyo: Oxford University Press, 1989. p. 818-825.
- CLARCK, L.; CLARCK, R. & KATZ, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. Clin Immunol Immunopathol 88: 35-45, 1998.
- COCCHIA, D.; MICHETTI, F. & DONATO, R. Immunochemical and immunocytochemical localization of S100 antigen in normal human skin. Nature 294: 85-87, 1981.
- CONNEY, A .H. Induction of drug metabolizing enzymes: a path to the discovery of multiple cytochromes P450. Annu Rev Pharmacol Toxicol 43:1-3-, 2003.
- CRIBIER, B. & GRASSHANS, E. Les Cytokeratines dans le peau et les muqueuses malpighiennes. Ann Dermatol Venereol 120:327-335, 1993.
- DALE, B.A . et al. Identification of fibrous proteins in fetal rat epidermis by electrophoretic and immunologic techniques. J Invest Dermatol 66: 230-235, 1976.
- DAMERON, K.M. et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science 265: 1582-1584, 1994.
- DEAMANT, F.D. & JANNACCONE, P.M. Clonal origin of chemically induced papillomas: separate analysis of epidermal and dermal components. J Cell Biol 88: 305-308, 1987.
- DI GIOVANNI, J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. Pharmacol Ther 54: 63-67, 1992.
- DI GIOVANNI, J. et al. Role of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in mouse skin carcinogenesis. Prog Clin Biol Res 387: 113-117, 1994.
- DLUGOSZ, A .A .& YUSPA, S.H. Carcinogenesis: chemical. In: FREEDBERG, I.M. et al. Dermatology in General Medicine. International ed. Mc Graw-Hill, 1999. p. 452-461.

DRAGAN, Y.P. & PITOT, H.C. Multistage hepatocarcinogenesis in the rat: insights into risk estimation. Prog Clin Biol Res 374: 261-279, 1992.

ELGJO, K. et al. Natural synchrony of newborn mouse epidermal cells in vitro. J Invest Dermatol 66: 292- 296, 1976.

ERNST, H. et al. Effect of local injection with basic fibroblast growth factor (BFGF) and neutralizing antibody to BFGF on gastric ulcer healing, gastric secretion, angiogenesis and gastric blood flow. J Physiol Pharmacol 52: 377-390, 2001.

FISHMAN, J.R.A. & PACKER, M.G. Malignancy and chronic wounds: Marjolin's ulcer. J Burn Care Rehabil 12: 218-223, 1991.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid, and other disease. Nat Med 1: 27-31, 1995a.

FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. Sem Med Beth Isr Hosp 26: 1757-1763, 1995b.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis, In: MENDELSON, J; HOWLEY, P. M. ; ISRAEL, M. A. ; LIOTTA, L.A. The molecular basis of cancer. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995c.p. 206-232.

FOLKMAN, J. et al. Duodenal ulcer: Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy which accelerates healing. Ann Surg 214: 414-427, 1991.

FREEDBERG, I.M. et al. Keratins and the keratinocyte activation cycle. J Invest Dermatol 116: 633-640, 2001.

FRIEDMAN, R.; HANSON, S. & GOLDBERG, L. H. Squamous cell carcinoma arising in a Leishmania scar. Dermatol Surg 29(11): 1148-1149, 2003.

FUJIKI, H. & SUGIMURA, T. New classes of tumor promoters: telocidin, aplasiatoxin, and palytoxin. Adv Cancer Res 49: 223-240, 1987.

GALLAGHER, R.P. et al. Chemical exposures, medical history, and risk of squamous and basal cell carcinoma of the skin. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 5: 419-422, 1996.

GUO, H. R.; YU, H.S.; HU, H. & MONSON, R. R. Arsenic in drinking water and skin cancers: cell type specificity (Taiwan, Roc). Cancer Causes Control 12(10):909-916, 2001.

GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYO, O. & BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon 18: 603-610, 1980.

GUTIÉRREZ, J.M. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. Mem Inst Butantan 52: 37-38, 1990.

GUTIÉRREZ, J.M & LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon 33: 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M et al. Isolation and characterization of metalloproteinases with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon 33: 19-29, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon 36: 1529-1538, 1998.

GUTIÉRREZ, J.M. & RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie 82: 841-850, 2000.

HAMMOND, J. S.; THOMSEN, S. & WARD, C.G. Scar carcinoma arising acutely in a skin graft donor site. Trauma 27(6): 681-683, 1987.

HEIZMANN, C.W.; FRITZ, G. & SCHAFER, B.W. S proteins: structure, functions and pathology. Front Biosci 7: 1356-1368, 2002.

HIROSHATA, S. et al. Enhanced generation of endothelial cells from CD34+ cell of the bone marrow in rheumatoid arthritis: possible role in synovial neovascularization. Arthritis Rheum 50:3888-3896, 2004.

HOLMGREN, L.; O'REILLY, M.S. & FOLKMAN, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med 1:149-153, 1995.

ISAYEVA, T.; REN, C. & PONNAZHAGAN, S. Recombinant adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic prevention in a mouse model of intraperitoneal ovarian cancer. Clin Cancer Res 11: 1342-1347, 2005.

ISOBE, T. & OKUYAMA, T. The amino sequence of the tryptophan-containing subunit (alpha-subunit) of bovine brain s-100 protein. J Neurochem 37: 522-524, 1981.

IVANY, D. et al. Absence of differentiation related expression of keratin 10 in early stages of vulvar squamous carcinoma. Differentiation 42: 124-129, 1989.

JAFFE, E.A. Cell biology of endothelial cells. Hum Pathol 18: 234-239, 1987.

JHAPPAN, C. et al. Transgenic mice provide genetic evidence that transforming growth factor alpha promotes skin tumorigenesis via H-ras-dependent and H-ras-independent pathways. Cell Growth Differ 5: 385-394, 1994.

JONASOSN, A. S. et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. Proc Natl Acad Sci USA 93: 14025- 14030, 1996.

JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil. Ver Assoc Méd Brás 36: 66-77, 1990.

KAMIGUTI, A .S.; ZUZEL, M. & THEAKSTON, R.D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins interactions with cells. Braz J Med Biol Res 31: 853-862, 1998.

KAWANO, J. et al. Vasculae endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; non-significance of hemorrhagic metalloproteinase. Toxicon 40: 1553-1562, 2002.

KIRSCH, M. et al. Therapy of hematogenous melanoma brain metastases with endostatin. Clin Cancer Res 11: 1259-1267, 2005.

KOIVISTO,L. et al. Integrins $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, and $\alpha v\beta 6$ collaborate in squamous carcinoma cel spreading and migration on fibronectin. Exp Cell Research 255:10-17, 2000.

KORGE, B.; STADLER, R. & MISCHKE, D. Effect of retinoids on hyperproliferation-associated keratins K6 and K16 in cultured human keratinocytes: a quantitative analysis. J Invest dermatol 95:450-455, 1990.

KULSKI, J.K. et al. Genomic and phylogenetic analysis of the S100 A7 (psoriasin) gene duplications within the region of the S100 gene cluster on human chromossome 1q21. J Mol Evol 56: 397-406, 2003.

KWA, R.E.; CAMPANA, K. & MOY, R.L. Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. J Am Acad Dermatol 26: 1-26, 1991.

LANE, E.B. et al. Stem cells in hair follicles-cytoskeletal studies. Ann NY acad Sci USA 642:197-213, 1991.

LEIGH, I.M.; et al. Monoespecific monoclonal antibodies to keratin 1 carboxy terminal (sythetic peptide) and to keratin 10 as markers of epidermal differentiation. Brit J dermatol 129: 110-119, 1993.

LOVE, R.L. & BREIDAHL, A. F. Acute squamous cell carcinoma arising within a recent burn scar in a 14-year-old boy. Plast Reconstr Surg 106(5): 1069-1071, 2000.

MACKIE, R.M. Epidermal skin tumor. In: CHAMPION, R.H.; BURTON, J.L.; BURNS, D.A .; BREATHNACH, S.M. Rook/ Wilkinson/ Ebling Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1998. CD-ROM.

MANCUSO, M. et al. Only a subset of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate promoted mouse skin papillomas are promotable by benzoyl peroxide. Mutat Res 548: 35-45, 2004.

MARKEY, A .C. et al. Expression of simple epithelial keratins 8 and 18 in epidermal neoplasia. J Invest Dermatol 97: 763-768, 1991.

MARKLAND, F.S. et al. Effect of Bjc1 (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. Toxicol 39:1471-1476, 2001.

MARKS, R.; RENNIE, G. & SELWOOD, T.S. Malignant transformation of solar keratosis to squamous cell carcinoma. Lancet 1: 795-797, 1988.

MEBS, D.; EHRENFELD, M. & SAMEJIMA, Y. Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. Toxicol 21: 393-404, 1983.

MELLO, L.F.B. et al. Chronic ulceration of the leg following extensive scarring due to snake bite complicated by squamous cell carcinoma. Skeletal Radiology 29: 298-301, 2000.

MELO, P.A . et al. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Elipta prostrata* (asteraceae) extracts and constituents. Toxicol 32: 595-603, 1994.

MERK. H.F. et al. Molecular pathways in dermatotoxicology. Toxicol Appl Pharmacol 195: 267-277, 2004.

MICHAEL, E. et al. Binding of keratin intermediate filaments (K10) to the cornified envelope in mouse epiderms: implications for barrier function. The Society for Investigative Dermatology 780-784, 1994.

MING, M.E. et al. Binding of keratin intermediate filaments (K10) to the cornified envelope in mouse epidermis: implication for barrier function. J Invest Dermatol 103: 780-784, 1994.

MIZUKI, A . et al. Mucosal concentration of basic fibroblast growth factor in the healing process in human giant gastric ulcers. J Gastroenterol Hepatol 5: 528-534, 2004.

MOLL, I. Cytokeratine: marker epithelialer differenzierung. Hautarzt 44:491-500, 1993.

MOLL, R. Epithelial tumor markers: cytokeratins and tissue polypeptide antigen (TPA). Curr Top Pathol 77:71-101, 1987.

MOLL, R. et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31: 11-24, 1982.

MOMMERS, J.M. et al. Novel functional multiparameter flow cytometric assay to characterize proliferation in skin. Cytometry 42: 43-49, 2000.

MOORE, B.W. A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Res Comm 19: 739-744, 1965.

MOURA DA SILVA, A .M. et al. Processing of pro-tumor necrosis factor alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. Eur J Immunol 26: 2000-2005, 1996.

MUKHOPADHYAY, R. et al. Increased levels of alpha 6 integrins are associated with metastatic phenotype of human breast cancer cells. Clin Exp Metastasis 17(4): 325-332, 1999.

NELSON, W.G. & SUN T-T. Thr 50- and 58 Kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. J Cell Biol 97:244-251, 1983.

NEUBAUER, O. Arsenical cancer. A review. Br J Cancer 1:192-251, 1974.

OWENS, D.M.; WEI, S.J.C. & SMART, R.C. A multihit, multistage model of chemical carcinogenesis. Carcinogenesis 9: 1837-1844, 1999.

OWNBY, C.L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In: SHIER, W.T. & MEBS, D. Handbook of Toxinology. New York, NY, USA:Marcel Dekker, 1990. p. 601-654.

PANDEY, M. Et al. Squamous cell carcinoma in untreated psoriasis: a case report. Indian Med Assoc 102(1):39-40, 2004.

PARK, H.R. & PARK, Y.K. Assessment of diagnostic utility of anti-CD34 in soft tissue tumors. J KorMed Sci 10: 436-441, 1995.

PELENGARIS, S.; RUDOLPH, B. & LITTLEWOOD, T. Action of Myc *in vivo*-proliferation and apoptosis. Curr Opin Genet Dev 10: 100-105, 2000.

PEPPER,M.S. et al. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun 189: 824-831, 1992.

POTTER, M. Percival Pott's contribution to research, 1974. Apud: CHAMPION, R.H.; BURTON, J.L.; BURNS, D.A .; BREATHNACH, S.M. Rook/ Wilkinson/ Ebling Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1998. CD-ROM.

PURKIS, P.E. et al. Antibody markers of basal cel in complex epithelia. J Cells Sci 97:39-50, 1990.

RAVASI, T. et al. Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. Genomics 84: 10-22, 2004.

REDDY, A .L.& FIALKOW, P.J. Influence of dose of initiator on two-stage skin carcinogenesis in Balb/c mice with cellular mosaicism. Carcinogenesis 9: 751-754, 1988.

Registro Nacional de Patologia Tumoral, 1981-1985. Apud: Accioly-Filho, J. W. Expressão das citoqueratinas nas lesões pré-malignas e maligna dos queratinócitos. Tese Mestrado, Curso de Pós-graduação em Dermatologia, Faculdade de Medicina-UFRJ, 144f, 1995.

REICHEL, J. & MAGIN, T. M. Hyperproliferation, induction of c-myc and 14-3-3 δ , but no cell fragility in keratin-10-null mice. J Cell Sci 115: 2639-2650, 2002.

RIDINGER, K. et al. Clustered organization of S100 genes in human and mouse. Biochim Biophys Acta 1448: 254-263, 1998

ROOP, D.R. et al. Expression of keratin genes in mouse epidermis and normal and malignantly transformed epidermal cells in culture. J Invest Dermatol 81: 144-149, 1983.

ROOP, D.R. et al. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. Cancer Res 48: 3245-3252, 1988.

ROSSUM, M.M. et al. Coexpression of keratins 13 and 16 in human keratinocytes indicates association between hyperproliferation-associated and retinoid-induced differentiation. Arch Dermatol Res 292: 16-20, 2000.

RUCAVADO, A . Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Exp Mol Pathol 63: 186-199, 1995.

RUCAVADO, A .; NUNEZ, J. & GUTIERREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper* . Int J Exp Pathol 79: 245-254, 1998.

RUCAVADO, A. et al. Inhibition of local and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. Am J Trop Med Hyg 63: 313-319, 2000.

RUCAVADO, A . et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. Med Inflamm 11: 121-128, 2002.

SAHNI, A . & FRANCIS, C. W. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates cell proliferation. Blood 96: 3772-3778, 2000.

SCHAFER, B.W. & HEIZMANN, C.W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci 21: 134-140, 1996.

SCHIFFER, R. et al. Active influx transport is mediated by members of the organic anion transporting polypeptide family in human epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol 120: 285-291, 2003.

SCHLEGEL, S.P.B. Keratin alterations during embryonic epidermal differentiation: a passage of adult epidermal maturation. J Cell Biol 93: 551-559, 1982.

SCHWARTZ, R. A. & STOLL, H.L. Lesiones precancerosas epiteliales, In: FREEDBERG, I, M. et al. Dermatologia en Medicina General. 3 ed. Buenos Aires: Panamericana, 1988. p. 866-867.

_____. Squamous cell carcinoma. In: FREEDBERG, I.M. et al. Dermatology in General Medicine. International ed. Mc Graw-Hill, 1999. p. 840-856.

SERPA, S. S. Expressão das integrinas e das proteínas da matriz extracelular nos carcinomas basocelulares. 1999. 112f. Dissertação (Mestrado em Dermatologia) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

SILVEIRA, K.S.O. et al. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. Resp Physiol Neurobiol 139: 167-177, 2004.

SIMENOVA, P.P. & LUSTER, M. I. Mechanisms of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms? J Environ Pathol Toxicol Oncol 19(3):281-286, 2000.

SMITH, J. et al Malignancy in chronic ulcers and scars of the leg (Marjolin's ulcer): a study of 21 patients. Skeletal Radiology 30(6):331-337, 2001.

STASIAK, P.C. et al. Keratin 19: Predicted aminoacid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. J Invest Dermatol 92:707-717, 1989.

STERN, M.C. et al. Genetic analyses of mouse skin tumor progression susceptibility using Sencar inbred derived strains. Mol Carcinog 35: 13-20, 2002.

SULICA, V., I. & KAO, G.F. Squamous cell carcinoma of the scalp arising in lesions of discoid lupus erythematosus. Am J Dermatopathol 10(2): 137-141, 1988.

SUND, M. et al. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. Proc Natl Acad Sci 102: 2934-2939, 2005.

SUNDELL, A. et al. In vitro procoagulant and anticoagulant properties of *Naja naja* venom. Toxicon 42: 239-247, 2003.

TAGUCHI, T. et al. Intracloal conversion from papilloma to carcinoma in the skin of Pgk-1a/Pgk-1b mice treated by a complete carcinogenesis process or by a initiation-promotion regimen. Cancer Res 44: 3779-3783, 1984.

THOMAS, G. J. et al. Expression of the alpha v beta 6 integrin promotes migration and invasion in squamous carcinoma cells. Journal of Investigative Dermatology 117(1); 67-73, 2001.

THORUP, A. K. et al. Can Alterations in integrin and laminin-5 expression be used as markers of malignancy? APMIS 106:1170-1180, 1998.

TROY, T.C.& TURKSEN, K. In vitro characteristics of early epidermal progenitors isolated from keratin 14 (K14)- deficient mice: insights into the role of keratin 17 in mouse keratinocytes. J Cell Physiol 180 409-421, 1999.

VAN WAES, C. et al. The A9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally and functionally similar to the newly defined integrin alpha 6 beta 4. Cancer Res 51: 2395- 2399, 1991.

WARRELL, D.A .& HARVEY, A .L. Clinical reports in Toxicol. Toxicol 33: 583-584, 1995.

WATT, F.M. & HOGAN, B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. Science 287: 1427-1430, 2000.

WEI, S.J.C. et al. Dose-dependent mutation profile in the c-Ha-ras proto-oncogene of skin tumors in mice initiated with benzopyrene. Carcinogenesis 20: 1689-1696, 1999.

WEISS, R.A.; EICHNER, R. & SUN T-T. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal disease: a 48 and 56 KD keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. J Cell Biol 98: 1397-1406, 1984.

WEISS, S.W. & NICKOLOFF, B.J. CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. Am J Surg Pathol 17: 1039-1045, 1993.

WINTER, H.; SCHWEIZER, J. & GOERTTLER, K. Keratin polypeptide composition as a biochemical tool for the discrimination of benign and malignant epithelial lesions in man. Arch Dermatol Res 275: 27-34, 1983.

WOODWORTH, C.D. et al. Strain-dependent differences in malignant conversion of mouse skin tumors in an inherent property of the epidermal keratinocyte. Carcinogenesis 25: 1771-1778, 2004.

WU Y-J & RHEINWALD, J.G. A new small (40KD) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. Cell 25: 627-635, 1981.

YUMIKO, K et al. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). Biochemistry 38: 11796-11803, 1999.

ZHOU, Q.; NAKADA, M. T & BROOKS, P. C. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin, binds to integrin $\alpha 5 \beta 1$. Biochem and Bioph Research Communications 267:350-355, 2000.

ZHOU, Q. et al. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. Breast Cancer Res Treat 61: 249-260, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)