

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**

**Raquel da Silva Ferreira**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO ENVENENAMENTO  
LOXOSCÉLICO EXPERIMENTAL E SEU TRATAMENTO COM SUBPRODUTOS  
DE CÉLULAS-TRONCO MESESQUIMAS**

**Belo Horizonte**  
**2025**

RAQUEL DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO ENVENENAMENTO  
LOXOSCÉLICO EXPERIMENTAL E SEU TRATAMENTO COM SUBPRODUTOS  
DE CÉLULAS-TRONCO MESESQUIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal  
Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Orientadora: Marília Martins Melo

Coorientadores: Jader dos Santos Cruz

Roberto Baracat de Araújo

Belo Horizonte  
2025

F383a Ferreira, Raquel da Silva, 1993-  
Avaliação dos efeitos cardiotóxicos do envenenamento loxoscélico experimental e seu tratamento com subprodutos de células-tronco mesenquimais/ Raquel da Silva Ferreira.- 2025.  
191 f: il.

Orientadora: Marília Martins Melo  
Coorientadores: Jader dos Santos Cruz  
Roberto Baracat de Araújo

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.  
Bibliografia f. 159 a 191.

1. Aranha marrom – Veneno - Teses – 2. Aranha – Veneno – Teses – 3. Loxosceles – Teses - I. Melo, Marília Martins - II. Cruz, Jader dos Santos – III. Araújo, Roberto Baracat de – IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**RAQUEL DA SILVA FERREIRA**

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **DOUTORA** em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Medicina e Cirurgia Veterinárias**. Defesa da tese intitulada: "**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOTÓXICOS DO ENVENENAMENTO LOXOSCÉLICO EXPERIMENTAL E SEU TRATAMENTO COM SUBPRODUTOS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**".

Aprovado(a) em 14 de julho de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marilia Martins Melo - Orientador(a)

Dr.(a). Luiz Eduardo Duarte de Oliveira

Dr.(a). Rubens Antônio Carneiro

Dr.(a). Clara Guerra Duarte

Dr.(a). Fernanda dos Santos Alves



Documento assinado eletronicamente por **Marilia Martins Melo, Professora do Magistério Superior**, em 15/07/2025, às 09:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clara Guerra Duarte, Usuário Externo**, em 15/07/2025, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda dos Santos Alves, Usuária Externa**, em 15/07/2025, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rubens Antonio Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 15/07/2025, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Eduardo Duarte de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 15/07/2025, às 20:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=4355017](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=4355017), informando o código verificador **4355017** e o código **CRC71C7431F**.

---

---

Folha de Aprovação RAQUEL DA SILVA FERREIRA (4355017)

SEI 23072.213929/2021-91 / pg.

1

Referência: Processo nº 23072.213929/2021-91

SEI nº 4355017

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por permitir que eu chegasse até aqui. A fé foi o combustível que me fez caminhar e me deu forças para superar os obstáculos.

Agradeço imensamente aos meus pais, Carlos e Katia, por sempre segurarem a minha mão e acreditarem em mim nos momentos em que eu mesma não acreditava. Nunca teria conseguido sem o amor e o apoio de vocês.

Ao Antônio e ao Vicente, por serem a minha família e fonte de amor e apoio incondicionais. Ao Antônio, que foi um ouvinte e melhor amigo em todas as etapas vividas, e até “colocou a mão na massa” para me ajudar. Ao Vicente, que me impulsiona a ser melhor com o seu sorriso e a sua alegria de viver.

À minha irmã Juliana, que sempre foi uma pessoa excepcional na minha vida e nunca mediu esforços para me amparar.

Agradeço à Professora Marília Martins Melo por todos os anos de convívio e os grandes aprendizados acadêmicos e de vida proporcionados. Foram etapas de muito crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor Jader dos Santos Cruz, que abriu as portas do seu laboratório para mim com todo o carinho e me deu inúmeras oportunidades de aprendizado e trabalho.

Ao Professor Roberto Baracat de Araújo, por toda a orientação e contribuições que tornaram esse trabalho melhor.

Ao Professor Carlos Delfin Chávez-Olórtegui, que nos auxiliou com as suas orientações e nos forneceu condições melhores para a execução deste trabalho.

Ao Professor Artur Santos-Miranda, que também foi um grande mentor e me auxiliou em todas as etapas desse processo, sempre com bom humor e boa vontade.

Não poderia esquecer das minhas grandes parceiras de laboratório: Paula, Anna Paula e Gabrielly, que estiveram comigo em todos os momentos de execução desse experimento, tornando tudo mais leve e divertido.

Aos queridos amigos que fiz no LAMEX, esse laboratório que me acolheu da melhor maneira possível. Fica difícil citar todos, mas agradeço especialmente ao Ivan, que se tornou um grande amigo e trabalhou bastante para que os resultados fossem possíveis.

Ao amigo Marco Túlio, que, além de auxiliar com as análises laboratoriais, foi muito solícito para quaisquer dúvidas, com toda a sua gentileza e presteza.

Agradeço a Biocon® pela gentil doação dos kits laboratoriais de CK-MB, cTnI e NT-pró-BNP, imprescindíveis para a realização do experimento.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais por me proporcionar educação de qualidade ao longo de todos esses anos, por sua estrutura e corpo docente inigualáveis. À Escola de Veterinária e ao Instituto de Ciências Biológicas, locais onde pude aprender e executar os experimentos da melhor forma.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (Processo: 308754/2021-2) e, pela bolsa de doutorado.

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses.”

(Rubem Alves)

## RESUMO

O veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* sp. é capaz de causar um quadro clínico denominado loxoscelismo, caracterizado por dermonecrose, injúria renal aguda e outros distúrbios sistêmicos, que, eventualmente, podem levar ao óbito. Todavia, pouco se sabe sobre os efeitos cardiotoxícos do veneno loxoscélico. Além disso, como não existe antídoto disponível na medicina veterinária, a busca por novas terapias eficazes é imperativa. Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos cardiotoxícos do veneno de *L. intermedia* em cobaias (*Cavia porcellus*) e a utilização do secretoma como tratamento nesse envenenamento. Para isso, foram utilizados 28 machos hígidos, distribuídos em cinco grupos: (A) desafiado com salina a 0,9% e tratado com salina a 0,9%; (B) desafiado com 14µg de veneno de *L. intermedia* e tratado com salina a 0,9%; (C) desafiado com salina a 0,9% e tratado com 160µg de secretoma; (D) desafiado com 14µg de veneno de *L. intermedia* e tratado com 160µg de secretoma; (E) desafiado com 14µg de veneno de *L. intermedia* e tratado com 0,2mL de soro antiloxoscélico humano (antiveneno). Durante 14 dias, os animais foram avaliados por meio de eletrocardiograma, e exames hematológicos e bioquímicos plasmáticos. Após esse período, os animais foram eutanasiados para avaliação anátomo-histopatológica e isolamento de cardiomiócitos para estudo da contratilidade e *patch clamp* (*ex-vivo*). Os resultados revelaram que o veneno loxoscélico foi capaz de interferir na atividade cardíaca, pois causou várias arritmias *in vivo* e alterações nos parâmetros de contratilidade e potencial de ação cardíacos (*ex-vivo*). Possivelmente, os efeitos deletérios do veneno sobre o coração ocorrem de maneira indireta, por alterações de oxigenação e vascularização causadas pela presença de coágulos, além de processos inflamatórios, tais como infiltrados linfo-plasmocitários e linfo-histioplasmocitários no miocárdio e endocárdio, visualizados na microscopia óptica. Em relação à nova terapia estudada, o uso do secretoma na dose de 160µg como tratamento do loxoscelismo não se mostrou superior ao uso do antiveneno. Mas, comparando os animais envenenados e tratados com secretoma aos tratados com placebo (grupo B), o número de arritmias cardíacas foi bem menor, o que sugere a necessidade de mais estudos para melhor caracterização da sua composição e estabelecimento de doses terapêuticas.

**Palavras-chave:** Araneísmo, cardiotoxicidade, células-tronco

## ABSTRACT

The venom of spiders of the genus *Loxosceles* sp. can cause a clinical condition called loxoscelism, characterized by dermonecrosis, acute kidney injury, and other systemic disorders that can eventually lead to death. However, little is known about the cardiotoxic effects of loxoscelic venom. Furthermore, since there is no antidote available in veterinary medicine, the search for effective new therapies is imperative. Given this context, the present study aimed to evaluate the cardiotoxic effects of *L. intermedia* venom in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and the use of secretome as a treatment for this envenomation. For this purpose, 28 healthy males were used and distributed into five groups: (A) challenged with 0.9% saline and treated with 0.9% saline; (B) challenged with 14µg of *L. intermedia* venom and treated with 0.9% saline; (C) challenged with 0.9% saline and treated with 160µg of secretome; (D), challenged with 14µg of *L. intermedia* venom and treated with 160µg of secretome; (E) - challenged with 14µg of *L. intermedia* venom and treated with 0.2mL of human antiloxoscelic serum (antivenom). For 14 days, the animals were evaluated by electrocardiogram, hematological, and plasma biochemical tests. After this period, the animals were euthanized for anatomohistopathological evaluation and isolation of cardiomyocytes for study of contractility and patch clamp (*ex vivo*). The results revealed that loxoscelic venom was able to interfere with cardiac activity, as it caused several arrhythmias *in vivo* and changes in cardiac contractility and action potential parameters (*ex vivo*). The deleterious effects of the venom on the heart may occur indirectly, such as changes in oxygenation and vascularization caused by the presence of clots, in addition to inflammatory processes, such as lymphoplasmacytic and lymphohistioplasmacytic infiltrates in the myocardium and endocardium, visualized under optical microscopy. Regarding the new therapy studied, the use of secretome at a dose of 160µg as a treatment for loxoscelism was not superior to the use of antivenom. However, when animals envenomed and treated with secretome were compared to animals treated with placebo (group B), the number of cardiac arrhythmias was much lower, which suggests the need for further studies to better characterize its composition and establish therapeutic doses.

**Key words:** Arachnidism, cardiotoxicity, stem-cell.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição das aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> spp. e do gênero <i>Sicarius</i> spp. em diferentes continentes. ....	23
Figura 2. Dimorfismo sexual entre aranhas da espécie <i>Loxosceles intermedia</i> .....	24
Figura 3. Características físicas exclusivas do gênero <i>Loxosceles</i> spp .....	25
Figura 4. Teia de aranha do gênero <i>Loxosceles</i> spp.....	25
Figura 5. Lesão eritematosa no membro posterior de paciente humano picado por uma aranha do gênero <i>Loxosceles</i> sp .....	30
Figura 6. Lesão ulcerativa característica do loxoscelismo .....	31
Figura 7. Lesão dermonecrótica na região interescapular de cobaia da espécie <i>Cavia porcellus</i> após envenenamento loxoscélico experimental.....	31
Figura 8. Desenho esquemático mostrando a evolução das células ao longo do desenvolvimento embrionário .....	34
Figura 9. Composição do tecido adiposo.....	36
Figura 10. Etapas do processo de isolamento de CT mesenquimais a partir de tecido adiposo .....	38
Figura 11. Secretoma, seus componentes, mecanismos de ação e efeitos celulares. ....	40
Figura 12. Correntes de membrana que geram um PA normal.....	44
Figura 13. Diferenças regionais na configuração do potencial de ação .....	46
Figura 14. Desenho esquemático demonstra a sequência de eventos estimulados pelo PA.....	51
Figura 15. Desenho esquemático da díade, evidenciando as principais proteínas envolvidas no balanço de canal de $Ca^{2+}$ do tipo L .....	51
Figura 16. Posicionamento dos eletrodos para realização do ECG em cobaia da espécie <i>Cavia porcellus</i> .....	55
Figura 17. Eletrofose SDS-PAGE do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> utilizado, em duas diferentes concentrações, e os valores de massa molecular da banda-padrão.....	61
Figura 18. Valores médios do eixo da onda P nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. ....	63
Figura 19. Valores médios do eixo da onda P em cada grupo experimental durante o tempo de observação. ....	64
Figura 20. Valores médios da duração da onda P nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	65
Figura 21. Valores médios da amplitude da onda P nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. ....	66
Figura 22. Valores médios da duração da onda P em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	68
Figura 23. Valores médios da amplitude da onda P em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	69
Figura 24. Valores médios da duração do intervalo PQ nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	70
Figura 25. Valores médios da duração do intervalo PQ em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	71
Figura 26. Valores médios do eixo do QRS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	74

Figura 27. Valores médios da amplitude do QRS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	75
Figura 28. Valores médios da duração do complexo QRS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. ....	75
Figura 29. Valores médios do eixo do QRS em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	76
Figura 30. Valores médios da amplitude do QRS em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	77
Figura 31. Valores médios da duração do QRS em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	78
Figura 32. Valores médios da duração do intervalo QTc nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	81
Figura 33. Valores médios da FC nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	82
Figura 34. Valores médios da duração do intervalo QTc em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	83
Figura 35. Valores médios da FC em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	84
Figura 36. Valores médios da amplitude da onda T nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	85
Figura 37. Valores médios da variação na amplitude da onda T em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	86
Figura 38. Traçado eletrocardiográfico de cobaia hígida mostrando ritmo sinusal.....	88
Figura 39. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B mostrando uma taquicardia sinusal.....	88
Figura 40. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B evidenciando extrassístoles ventriculares.....	88
Figura 41. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B mostrando uma taquicardia atrial .....	89
Figura 42. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B, no qual se observa ritmo juncional. ....	89
Figura 43. Traçado de cobaia do grupo C.....	89
Figura 44. Traçado de cobaia do grupo C.....	89
Figura 45. Traçado de cobaia do grupo D .....	90
Figura 46. Valores médios do número total de ERI nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	92
Figura 47. Valores médios do número total de ERI em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	93
Figura 48. Valores médios da concentração de Hb nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	95
Figura 49. Valores médios da concentração de Hb em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	97
Figura 50. Valores médios do Ht nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	98
Figura 51. Valores médios do Ht em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	100

Figura 52. Valores médios do VCM nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	101
Figura 53. Valores médios do VCM em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	102
Figura 54. Valores médios do CHCM nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	103
Figura 55. Valores médios do CHCM em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	104
Figura 56. Valores médios do RDW-CV nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	105
Figura 57. Valores médios de RDW-CV em cada grupo experimental durante o tempo de observação. ....	108
Figura 58. Valores médios da contagem de PLT nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	109
Figura 59. Valores médios da contagem de PLT em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	110
Figura 60. Valores médios da contagem de LEU totais nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	111
Figura 61. Valores médios da contagem de LEU totais em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	112
Figura 62. Valores médios da contagem de HET nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	113
Figura 63. Valores médios da contagem de HET em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	114
Figura 64. Valores médios da contagem de LINF nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	115
Figura 65. Valores médios da contagem de MON nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	116
Figura 66. Valores médios da contagem de EOS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	116
Figura 67. Valores médios da contagem de LINF em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	117
Figura 68. Valores médios da contagem de MON em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	118
Figura 69. Valores médios da contagem de EOS em cada grupo experimental durante o tempo de observação .....	119
Figura 70. Variações na concentração de CK-MB nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação .....	120
Figura 71. Valores médios da concentração de cTnI nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. ....	121
Figura 72. Lesões macroscópicas na pele das cobaias .....	123
Figura 73. Lesão hiperêmica discreta na pele de cobaia do grupo C .....	124
Figura 74. Microscopia óptica da pele de cobaia hígida. ....	125
Figura 75. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo B .....	127
Figura 76. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo C .....	129
Figura 77. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo D .....	130
Figura 78. Microscopia óptica do subcutâneo de cobaia do grupo D.....	130

Figura 79. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo E (veneno + soro) .....	131
Figura 80. Representação gráfica do escore atribuído às lesões histopatológicas da pele nos diferentes grupos experimentais .....	133
Figura 81. Comparação do aspecto macroscópico do coração de cobaia saudável e de cobaia do grupo B .....	133
Figura 82. Coração de cobaia do grupo B no momento da necropsia .....	134
Figura 83. Coração de cobaia do grupo C com aspecto hemorrágico .....	134
Figura 84. Coração de cobaia do grupo D .....	135
Figura 85. Microscopia óptica do coração de cobaia hígida .....	136
Figura 86. Microscopia óptica do coração de cobaia do B.....	137
Figura 87. Microscopia óptica evidenciando a presença de um coágulo circundado por HET num animal do grupo B .....	138
Figura 88. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo B .....	138
Figura 89. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo C .....	139
Figura 90. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo D .....	140
Figura 91. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo E.....	141
Figura 92. Representação gráfica do escore atribuído às lesões histopatológicas do coração nos diferentes grupos experimentais .....	141
Figura 93. Média e o desvio-padrão do tempo para o relaxamento 50% nos diferentes grupos experimentais.....	145
Figura 94. Média e desvio-padrão do relaxamento (1Hz e 3Hz) e da amplitude do pico (1Hz e 3Hz) nos diferentes grupos experimentais.....	146
Figura 95. Média e desvio-padrão da fração de encurtamento (1Hz e 3Hz) e do tempo para o pico (1Hz e 3Hz) nos diferentes grupos experimentais.....	147
Figura 96. Média e desvio-padrão do tempo para contração (1Hz e 3Hz) e do tempo para a contração 50% (1Hz e 3Hz) nos diferentes grupos experimentais.....	148
Figura 97. Perfil da contratilidade em cada grupo experimental.....	149
Figura 98. Comportamento do potencial de ação de cada grupo experimental.....	150
Figura 99. Média e desvio-padrão do potencial de repouso, da amplitude do pico, da duração do potencial a 50% e duração do potencial a 10% nos diferentes grupos experimentais.....	151

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Famílias de toxinas do gênero <i>Loxosceles</i> spp. ....	27
Quadro 2. Indicações de uso do soro antiloxoscélico.....	33
Quadro 3. Principais correntes envolvidas no PA e suas correspondentes características .....	47
Quadro 4. Grupos / desafios / tratamentos .....	54
Quadro 5. Valores de referência dos parâmetros eletrocardiográficos de <i>Cavia porcellus</i> .....	62
Quadro 6. Alterações eletrocardiográficas identificadas nos diferentes grupos ao longo do experimento .....	87
Quadro 7. Valores de referência de parâmetros hematológicos e bioquímicos de cobaias .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

AD – Átrio direito

Adip-CTM – Células-tronco mesenquimais obtidas a partir de tecido adiposo

AE – Átrio esquerdo

ANOVA – Análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

AV – Atrioventricular

BAV – Bloqueio atrioventricular

$\text{Ca}^{2+}$  – Cálcio

$\text{CaCl}_2$  – Cloreto de cálcio

CD – Cluster de diferenciação

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CIB – *Cell isolated buffer*

CK – Creatinofosfoquinase

CK-MB – Fração MB da creatinofosfoquinase

Cm – Centímetro

CPPI – Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

cTnC – Troponina cardíaca C

cTnI – Troponina cardíaca I

cTn – Troponina cardíaca

cTnT – Troponina cardíaca T

CT – Célula-tronco

CTA – Célula-tronco adulta

CK – Creatinofosfoquinase

CTM – Célula-tronco mesenquimal

DAD – *Delayed after depolarization*

DMN – Dose mínima necrosante

DHPR – dihidropiridina

EA – Extrassístole atrial

EAD – *Early after depolarization*

EC – Acoplamento-excitação-contração

ECG – Eletrocardiograma  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EGTA – Ácido egtázico  
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
ERI – Eritrócitos  
EOS – Eosinófilos  
EV – Extrassístole ventricular  
EV-UFMG – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais  
FC – Frequência cardíaca  
FEV – Fração estromal vascular  
Hb – Hemoglobina  
HE – Hematoxilia-eosina  
HEPES - Ácido N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-2-etanossulfônico  
HET – Heterófilos  
HCN – Canais hiperpolarizantes ativados por nucleotídeos  
Ht – Hematócrito  
Hz – Hertz  
IFATS – *International Federation for Adipose Therapeutics and Science*  
iCTP – Célula-tronco pluripotente induzida  
IC – Insuficiência cardíaca  
ID – Intradérmico  
Ig – Imunoglobulina  
IP – Intraperitoneal  
ISCT – *International Society for Cellular Therapy*  
IRA – Injúria renal aguda  
IV – Intravenoso  
K<sup>+</sup> – Potássio  
KCl – Cloreto de potássio  
Kg – Quilograma  
KHz – Quilohertz  
KOH – Hidróxido de potássio  
LEC – Líquido extracelular  
LEU – Leucócitos  
LIC – Líquido intracelular  
LINF – Linfócitos

MB – Mioglobina  
mg – Miligrama  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
mL – Mililitro  
mM – Milimol  
mmHg – Milímetro de mercúrio  
ms - Milissegundo  
MON – Monócitos  
MΩ – Mega Ohm  
Na<sup>+</sup> – Sódio  
nA – Nano Amper  
NaCl – Cloreto de sódio  
NANOG – *Nanog homeobox*  
NAV – Nó átrio-ventricular  
NSA – Nó sinoatrial  
NT-pró-BNP – Porção N-terminal do pró-hormônio proBNP  
OCT4 – *Octamer-binding transcription factor*  
PA – Potencial de ação  
PAGE – Eletroforese em gel poliacrilamida  
PBS – *Phosphate buffered saline*  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PLT – Plaquetas  
QTc – Intervalo QT corrigido  
RDW – *Red cell distribution-width*  
RDW-CV – Coeficiente da variação do RDW  
Rpm – Rotações por minuto  
RyR – Receptor de rianodina  
s – Segundos  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SERCA – Ca<sup>2+</sup>ATPase do sarcoplasma  
SOCS2 – *Sex determining region T-box2*  
TA – Tecido adiposo  
TAt – Taquicardia atrial  
TS – Taquicardia sinusal  
TCTP – *Translational Controlled Tumour Protein*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

V – Volts

VCM – Volume corpuscular médio

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

XANADU – *Xeno-free and human component free media*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1.    Objetivo geral .....	22
2.2.    Objetivos específicos .....	22
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
3.1.    Loxoscelismo.....	23
3.1.1.  Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> spp.....	23
3.1.2.  Epidemiologia dos acidentes loxoscélicos .....	26
3.1.3.  Características do veneno loxoscélico .....	26
3.1.4.  Fisiopatologia do envenenamento loxoscélico e sinais clínicos.....	29
3.1.5.  Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.....	32
3.2.    Uso de células-tronco mesenquimais e os seus subprodutos na medicina regenerativa e no tratamento do envenenamento por animais peçonhentos .....	34
3.3.    Acoplamento-excitação-contração e potencial de ação cardíaco .....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
4.1.    Animais .....	52
4.2.    Veneno.....	52
4.3.    Secretoma .....	52
4.4.    Soro antiloxoscélico .....	53
4.5.    Delineamento experimental.....	53
4.6.    Eletrocardiograma .....	55
4.7.    Hematologia .....	56
4.8.    Exames bioquímicos sanguíneos.....	56
4.9.    Avaliação anátomo-histopatológica .....	56
4.10.   Isolamento dos cardiomiócitos .....	56
4.11.   Registros da contratilidade cardíaca .....	57
4.12.   Patch clamp.....	58
4.13.   Análise estatística .....	59
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
5.1.    Seleção dos animais e das doses utilizadas .....	60
5.2.    Eletrocardiograma .....	62
5.3.    Hematologia e bioquímica plasmática.....	91
5.3.1.  Exames hematológicos .....	92
5.3.2.  Exames bioquímicos plasmáticos.....	120

5.4.	Exames anátomo-histopatológicos .....	123
5.4.1.	Pele .....	123
5.4.2.	Coração.....	133
5.5.	Contratilidade cardíaca e <i>patch clamp</i> .....	144
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>157</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>158</b>
<b>ANEXO.....</b>		<b>192</b>

## 1. Introdução

As aranhas do gênero *Loxosceles* são capazes de causar um quadro clínico, que pode ser local ou sistêmico, denominado loxoscelismo. Como a dermonecrose é sua principal consequência e o percentual de quadros sistêmicos é relativamente baixo, a maioria dos estudos tem foco nas lesões de pele e em possíveis complicações mais comuns, como hemólise e injúria renal (Gremski et al., 2022). Todavia, há uma lacuna na literatura médica e veterinária em relação ao potencial cardiotoxico do veneno loxoscélico. Foram reportados dois relatos de casos clínicos de pacientes humanos que apresentaram complicações cardíacas após o envenenamento loxoscélico (Langner et al., 2021; Navarro-Martinez et al., 2022), mas não existem pesquisas que demonstrem a ação cardiotoxica do veneno *in vivo*. Além disso, diferentemente da medicina humana, na veterinária não existe tratamento específico com soro antiloxoscélico (Rodrigues et al., 2024). O tratamento é instituído conforme os sinais clínicos observados, incluindo antibióticos de amplo espectro, corticosteroides, dapsona e ácido acetilsalicílico (Da Silva et al., 2004). Mesmo na medicina humana, ainda existem muitas contradições em relação à terapia mais eficaz no tratamento de lesões dermonecroticas e sistêmicas decorrentes de acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles*.

O crescente avanço da medicina regenerativa com o uso de células-tronco mesenquimais e os seus subprodutos têm mostrado resultados promissores no tratamento de patologias de vários sistemas orgânicos. Estudos experimentais já demonstram benefícios no uso dessas terapias em casos de envenenamentos com animais peçonhentos (Sanchez-Castro et al., 2021; Martins et al., 2022; Rodrigues et al., 2024), sugerindo um campo a ser explorado, especialmente em relação aos seus efeitos sistêmicos.

Dessa forma, é imperativo o estudo dos efeitos cardiotoxicos do veneno loxoscélico *in vivo* e a compreensão dos possíveis mecanismos envolvidos (*ex-vivo*), assim como a busca por um tratamento eficiente, com a utilização de um produto oriundo das células-tronco mesenquimais, como o secretoma, na antagonização das lesões locais e sistêmicas do loxoscelismo.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Estudar a cardiotoxicidade do veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias (*Cavia porcellus*) e avaliar o potencial terapêutico do secretoma.

### 2.2. Objetivos específicos

- As cobaias serão submetidas ao envenenamento loxoscélico experimental com veneno de *Loxosceles intermedia* e serão tratadas com secretoma ou soro antiloxoscélico. Esses animais passarão pelos procedimentos e análises descritos abaixo.
- Estudar a atividade elétrica do coração de cobaias por meio do eletrocardiograma (ECG).
- Investigar o perfil hematológico.
- Avaliar o perfil bioquímico cardíaco, composto por fração mioglobina (MB) da creatinofosfoquinase (CK-MB), troponina cardíaca I (cTnI) e fração inativa do peptídeo natriurético do tipo B (NT-proBNP).
- Analisar a capacidade de contração do músculo cardíaco de cobaias, por meio da contratilidade de cardiomiócitos isolados.
- Verificar o potencial de ação do músculo cardíaco de cobaias por meio de *patch clamp*.
- Descrever as alterações anátomo-histopatológicas do coração e pele das cobaias.

### 3. Revisão de literatura

#### 3.1. Loxoscelismo

##### 3.1.1. Aranhas do gênero *Loxosceles* spp.

A primeira descrição do gênero das aranhas *Loxosceles* foi feita em 1832 (Platnick, 2000; Lucas, 2015), e atualmente obedece à seguinte caracterização taxonômica: família *Sicariidae*, sub-ordem *Labidognatha*, ordem *Araneida*, classe *Arachnida* e filo *Arthropoda*. Desde então, mais de 140 espécies já foram reconhecidas. As evidências sugerem que um ancestral em comum deu origem aos gêneros *Loxosceles* e *Sicarius*, na Gondwana Ocidental, grande placa continental que posteriormente se fragmentou, dando lugar à África e América do Sul. Na atualidade, essas aranhas estão distribuídas mundialmente, como mostrado na figura 1 (Platnick, 2000; Binford et al., 2008).

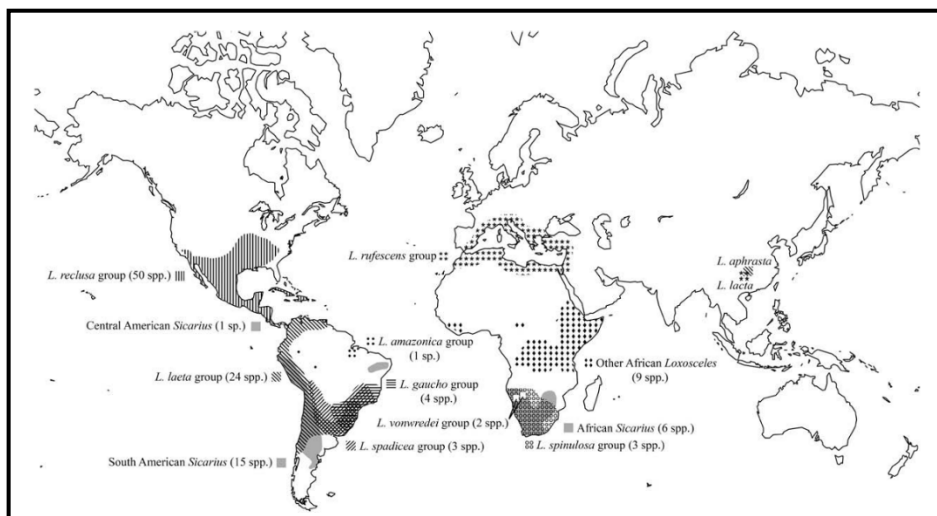


Figura 1. Distribuição das aranhas do gênero *Loxosceles* spp. e do gênero *Sicarius* spp. em diferentes continentes. Estão evidenciadas as principais espécies encontradas em cada localidade. Fonte: Binford et al., 2008.

Popularmente, são conhecidas como aranha-marrom devido à sua coloração, que varia de tons acastanhados a marrom escuro. Possuem o cefalotórax em formato de violino, sendo também chamadas de aranha violino. São pequenas, com comprimento entre 1 e 5 centímetros (cm), e possuem seis pares de olhos dispostos em “U”. As particularidades da disposição dos olhos auxiliam na sua identificação. Além disso, apresentam dimorfismo sexual. As fêmeas são

maiores do que os machos e possuem capacidade de inocular maior quantidade de veneno (Chaim et al., 2011). A figura 2 mostra as diferenças entre machos e fêmeas, e, na figura 3, é possível observar o posicionamento dos olhos.

São consideradas sinantrópicas, pouco agressivas e possuem hábitos noturnos. São amplamente adaptáveis, capazes de sobreviver em variados climas e altitudes. Toleram temperaturas ambientais que variam de 8 °C a 43 °C e preferem locais escuros como habitat. A sua sobrevivência média é de 1117 dias para as fêmeas e 557 dias para os machos. Têm alta capacidade reprodutiva e conseguem viver por períodos longos sem água ou alimento (Gremski et al., 2014).

Constroem teias que se assemelham a fios de algodão (Figura 4) e costumam se abrigar em armários, dentro de sapatos, pilhas de tijolos, telhas e madeiras, o que possibilita que sejam transportadas para outros ambientes. A maioria dos acidentes ocorre quando o corpo de uma aranha é prensado contra sapatos e outros objetos (Tambourgi et al., 2010).

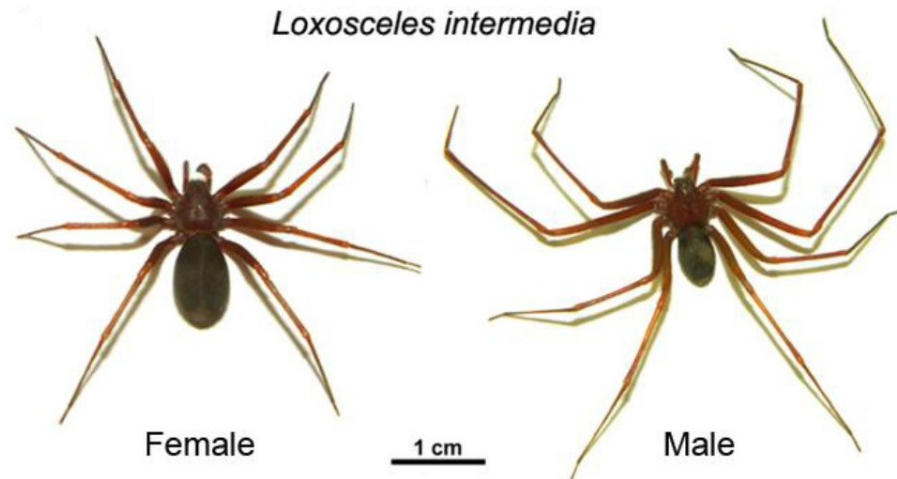


Figura 2. Dimorfismo sexual entre aranhas da espécie *Loxosceles intermedia*. À esquerda, observa-se uma aranha fêmea. À direita, observa-se o macho da mesma espécie. É possível perceber que as fêmeas são maiores e mais robustas. Fonte: Chaim et al., 2011.



Figura 3. Características físicas exclusivas do gênero *Loxosceles* spp. Observam-se os três pares de olhos distribuídos em semicírculo ou em "U", apontados pela cabeça de seta preta. Essa é uma particularidade que facilita a identificação das aranhas do gênero *Loxosceles* spp. Fonte: Chaim et al., 2011.



Figura 4. Teia de aranha do gênero *Loxosceles* spp. em domicílio rural na cidade de Jacutinga, em Minas Gerais. Fonte: Silveira e Souza, 2017.

### 3.1.2. Epidemiologia dos acidentes loxoscélicos

Com base no boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde, o acidente causado pelas aranhas do gênero *Loxosceles* foi o araneísmo mais comum entre os anos de 2017 e 2022 em todo o Brasil (Brasil, 2022). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), entre os anos de 2022 e 2024, foram registrados 15.222 acidentes com aranhas no Brasil. Destes, 8.828 foram causados pelo gênero *Loxosceles* e apenas 13 resultaram em óbito. Apesar dessa baixa taxa de óbito, o loxoscelismo é um grave problema de saúde pública no Brasil, por poder acarretar sequelas graves, especialmente por conta da mionecrose.

Os estados brasileiros com maior número de notificações de loxoscelismo são: Paraná, seguido de Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Dentre as aranhas-marron, as espécies de maior importância são *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, sendo que a maioria dos acidentes loxoscélicos ocorre nos meses mais quentes do ano, em pessoas do sexo masculino, economicamente ativas e, moradores de zona urbana (Silveira & Souza, 2017).

Não existem dados epidemiológicos na medicina veterinária, mas observa-se um aumento exponencial de casos clínicos de dermonecrose com evolução para o loxoscelismo sistêmico e óbitos, especialmente em cães (Rodrigues et al., 2024). Dessa forma, são necessárias medidas públicas para controle de aranhas, preparo dos profissionais de saúde para atender esses casos e notificação adequada.

### 3.1.3. Características do veneno loxoscélico

O veneno de *Loxosceles* spp. é um líquido incolor, cristalino e viscoso, produzido por duas glândulas bulbosas presentes no cefalotórax, sendo transportado por um aparato inoculador composto por dois pares de quelíceras. É uma mistura complexa de proteínas e peptídeos. Poucos microlitros ( $\mu\text{L}$ ) são produzidos por uma aranha, com o conteúdo proteico que pode variar de 20 a 200 microgramas ( $\mu\text{g}$ ). Características como o sexo, idade, alimentação e condições ambientais interferem na composição do veneno produzido por cada aranha (Senff-Ribeiro et al., 2008).

Em 1947, foi publicado o primeiro trabalho experimental, utilizando a cobaia, sobre os efeitos da picada de *L. laeta* (Macchiavello, 1947). Nas décadas de 1960 e 1970, surgiram estudos a respeito da caracterização do veneno, uma vez que, até então, a literatura disponível relatava os seus efeitos *in vivo* e *in vitro*, mas ainda não havia informações sobre a sua

composição. Morgan (1969) foi o primeiro pesquisador a descrever as características físicas, volume de veneno extraído por aranha e o seu conteúdo proteico. Em seguida, vários experimentos com o uso de eletroforese e cromatografia foram desenvolvidos, o que permitiu maior entendimento acerca de componentes e as suas funções biológicas (Wright et al., 1973; Heitz & Norment, 1974; Geren et al., 1976). Além destes, análises da massa molecular demonstraram os principais grupos de proteínas, como descrito no Quadro 1.

Os estudos avançaram, permitindo a identificação e caracterização das principais substâncias do veneno. Existem as toxinas altamente expressadas, representadas pelas fosfolipases, metaloproteases e peptídeos com atividade inseticida. Hialuronidases, serinoproteases, inibidores de proteases, fatores alérgenos e *Translational Controlled Tumour Protein* (TCTP) são expressos em menor quantidade (Gremski et al., 2020).

Análises de transcrito quantificaram a codificação de toxinas das glândulas bulbosas de *Loxosceles intermedia*, o que permitiu determinar a composição total do veneno. Foi proposto o nome LoxTox para o conjunto de genes homólogos responsáveis pela codificação das fosfolipases do gênero *Loxosceles* sp. (Kalapothakis et al., 2007). O perfil quantitativo de genes responsáveis pela codificação das toxinas foi: 32,1% de toxinas da família LiTx3; 22,6% de metaloproteases semelhantes à astacina; 20,2% de fosfolipases e o restante está relacionado a outras toxinas (Gremski et al., 2010).

Quadro 1. Famílias de toxinas do gênero *Loxosceles* spp.

Toxina	Massa molecular (KDa)	Características e ações descritas
Peptídeos inseticidas	5-8	- Membros da família de toxinas LiTx - Provável ação em canais de $Na^+$
Metaloproteases	28-35	- Presente no veneno de diferentes espécies do gênero <i>Loxosceles</i> - Atividade gelatinolítica, fibrinolítica e fibrinogeniolítica
Fosfolipases D	30-35	- Várias isoformas com efeitos variáveis

		- Dermonecrose, hidrólise de lipídeos, hemólise, agregação plaquetária <i>in vitro</i> , infiltração de células inflamatórias, edema, distúrbios renais, citotoxicidade <i>in vitro</i> , letalidade, ativação de citocinas
Hialuronidases	41-43	- Presente no veneno de diferentes espécies do gênero <i>Loxosceles</i> - Atividade no ácido hialurônico e sulfato de condroitina
<i>Translational Controlled Tumour Protein</i> (TCTP)	46	- Identificado no transcriptoma de espécies do gênero <i>Loxosceles</i> - Fator de liberação de histamina no ambiente celular, estabilização de microtúbulos, proliferação celular
Serinoproteases	85-95	- Atividade gelatinolítica - Ativada <i>in vitro</i> pela tripsina - Presente no veneno de <i>L. intermedia</i> e <i>L. laeta</i>
ATPase	Indeterminado	- Hidrólise de ATP
Fosfatase alcalina	Indeterminado	- Degrada o substrato sintético p-nitrofenil fosfato
Fator semelhante à lectina	Indeterminado	- Ligação com moléculas de carboidratos, ativação do complemento, endocitose, organização da matriz intracelular
Inibidores de proteases de cisteína e serina	Indeterminado	- Identificado no transcriptoma e proteoma de <i>Loxosceles</i> spp. - Podem estar relacionados aos processos de coagulação, fibrinólise e inflamação

Fonte: Adaptado de Chaim et al., 2011.

A mesma avaliação foi realizada com as espécies *L. simillis* e *L. laeta*, demonstrando que as transcrições de glândula venenosa que codificam as fosfolipases correspondem a 15% e 16%, respectivamente (Fernandes-Pedrosa et al., 2008; Dantas et al., 2016). Embora as fosfolipases não sejam as toxinas mais expressadas no veneno do gênero *Loxosceles* sp., elas

são as mais estudadas e caracterizadas. Além disso, as fosfolipases são capazes de, isoladamente, produzir todos os efeitos do envenenamento loxoscélico (Gremski et al., 2020).

Atualmente, as principais pesquisas sobre o veneno de *Loxosceles* sp. são realizadas na área de bioengenharia, explorando a expressão de toxinas recombinantes, que podem ser utilizadas para a produção de antivenenos, estudo dos efeitos biológicos dessas substâncias e demais aplicações terapêuticas (Chaves-Moreira et al., 2019).

#### 3.1.4. Fisiopatologia do envenenamento loxoscélico e sinais clínicos

A principal função do veneno é paralisar as presas da aranha no momento da caça. Não é primariamente um mecanismo de defesa, o que faz com que os envenenamentos ocorram incidentalmente (Barbaro et al., 1992). A apresentação clínica, também chamada de loxoscelismo, pode se dar de duas formas: loxoscelismo cutâneo, que ocorre em 70% dos casos, na qual se observam alterações no local da picada, caracterizadas por dor, queimação, coceira, eritema e dermonecrose (Rodrigues et al., 2024); loxoscelismo visceral ou sistêmico, que ocorre em 1 a 27% dos casos, no qual, além da dermonecrose, há ocorrência de anemia hemolítica, trombocitopenia e injúria renal aguda (IRA). Pode, ainda, haver comprometimento de outros sistemas orgânicos (Lopes et al., 2020; Gremski et al., 2022).

O maior efeito produzido pelas fosfolipases, principais toxinas responsáveis pela sintomatologia do loxoscelismo, é a degradação da membrana celular fosfolipídica. A sua ação é predominante na esfingomielina. Ocorre, então, perda de simetria, organização e fluidez da membrana plasmática, assim como ativação de vias intracelulares. Além disso, há liberação de prostaglandinas, ativação do complemento, estímulo à agregação plaquetária, aumento da quimiotaxia de neutrófilos e inflamação (Huwiler et al., 2000; McDermott et al., 2004). As alterações na membrana celular são capazes de modificar o seu potencial de superfície, afetando as propriedades de alguns canais iônicos. Além disso, as fosfolipases podem ser um meio farmacológico efetivo para ativar canais voltagem-dependentes (Ramu et al., 2006).

Considerando as ações das fosfolipases, essas são capazes de promover uma infiltração intensa de polimorfonucleares na derme, ocasionando dermonecrose, que histologicamente é classificada como necrose coagulativa asséptica (Ospedal et al., 2002).

As hialuronidas realizam predominantemente a degradação do ácido hialurônico e podem ter ação na condroitina, sulfato de condroitina e o sulfato dermatan (Da Silveira et al.,

2007). São conhecidas como fatores de espalhamento, uma vez que decompõem componentes da matriz extracelular e facilitam a difusão de toxinas a tecidos adjacentes ao local de inoculação (Girish & Kemparaju, 2005).

Os sinais clínicos diferem entre mamíferos, evidenciando variações na toxicidade conforme a espécie. Seres humanos, coelhos e cobaias desenvolvem dermonecrose. Todavia, ratos e camundongos não apresentam dermonecrose, manifestando sinais sistêmicos (da Silva et al., 2004).

Casos leves de loxoscelismo cutâneo apresentam apenas uma reação eritematosa no local da picada (Figura 5). Em casos moderados a intensos, a picada é indolor no primeiro momento, evoluindo para dor, sensação de queimação e eritema dentro de algumas horas. Observa-se uma área central de coloração violeta e bordas pálidas, além do espalhamento gravitacional (Figuras 6 e 7). Algumas lesões são autolimitantes e cicatrizam por segunda intenção. Em casos mais graves a necrose pode ser extensa e necessitar de tratamento individualizado, como abordagem cirúrgica da ferida (Futrell, 1992; Swanson & Vetter, 2006).

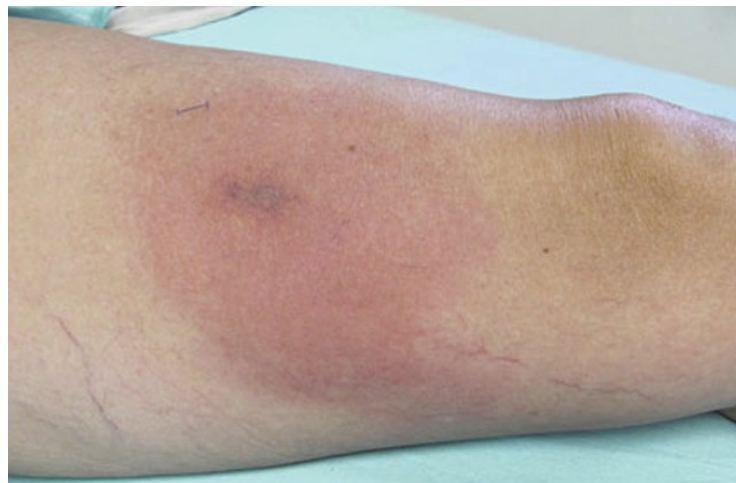


Figura 5. Lesão eritematosa no membro posterior de paciente humano picado por uma aranha do gênero *Loxosceles* sp. Fonte: (Malaque et al., 2015).

O loxoscelismo sistêmico é variável e os principais sintomas observados em humanos são mal-estar, febre, fadiga, mialgia, erupções cutâneas, icterícia, anemia hemolítica, urina escura em função de hemoglobinúria e rabdomiólise (Gremski et al., 2022). Além dos sinais citados, há relatos de lesões cardíacas e cerebrais em pacientes humanos. As manifestações cardíacas relatadas foram dois casos de miocardite e um caso de síndrome de Kounis (Langner

et al., 2021; Navarro-Martinez et al., 2022). Já o caso neurológico se trata de uma neuropatia do nervo óptico após a picada da aranha (Mantopoulos et al., 2016). Essas manifestações são raras. Acometimento cardíaco e hepático também foram demonstrados sob condições experimentais (de Oliveira Christoff et al., 2008; Dias-Lopes et al., 2010).



Figura 6. Lesão ulcerativa característica do loxoscelismo (Malaque et al., 2015).



Figura 7. Lesão dermonecrótica na região interescapular de cobaia da espécie *Cavia porcellus* após envenenamento loxoscélico experimental. Fonte: Arquivo pessoal.

A patofisiologia do loxoscelismo sistêmico não é totalmente elucidada, uma vez que há comprometimento de diferentes órgãos e tecidos. Os eventos hemolíticos são considerados efeito das fosfolipases, pois a ação hemolítica *in vitro* já foi detectada. Outros estudos demonstram a ocorrência de hemólise e trombocitopenia em animais envenenados, sugerindo

ação do veneno nos eritrócitos e nas plaquetas. Tais eventos variam entre espécies animais (Da Silva et al., 2003a; Tavares et al., 2004a). Da mesma forma, a ocorrência de injúria renal aguda (IRA) é atribuída a efeitos diretos do veneno nos rins, especialmente das fosfolipases, uma vez que se observam danos às células renais quando há exposição do órgão às toxinas (Chaim et al., 2006). Além disso, a nefrotoxicidade não parece estar relacionada à dermonecrose, por haver espécies animais que não desenvolvem necrose, mas apresentam IRA, como se observa em ratos e camundongos (Luciano et al., 2004; Kusma et al., 2008).

### 3.1.5. Diagnóstico e tratamento do loxoscelismo

Não existe um teste laboratorial eficiente e confiável para realização do diagnóstico do loxoscelismo. Dessa forma, o diagnóstico é baseado na epidemiologia da região e nos sinais clínicos apresentados. A captura da aranha também é uma forma de diagnóstico, considerando a apresentação clínica e relato do acidente. Entretanto, nem sempre essa captura é realizada ou possível (Gremski et al., 2022).

Várias pesquisas foram desenvolvidas no intuito de facilitar e desenvolver métodos diagnósticos. Já foram propostas diferentes técnicas para identificação de componentes do veneno a partir de biópsias das lesões de pele ou *swab* das mesmas, como: inibição de hemaglutinação (Barrett et al., 1993); *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) (Chávez-Olórtegui et al., 1998); anticorpos policlonais desenvolvidos a partir de proteínas recombinantes (Stoecker et al., 2006) e *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Sapag et al., 2014). Contudo, ainda são necessários mais estudos para comprovação da eficácia de alguns métodos ou para sua produção em larga escala.

A dermonecrose observada no loxoscelismo é um desafio terapêutico (Swanson & Vetter, 2006). Não existe um tratamento que seja considerado padrão-ouro. De acordo com levantamento bibliográfico realizado por Azuara-Antonio et al. (2023), os tratamentos mais descritos na literatura são à base de corticoides ou anti-inflamatórios não esteroidais, uso de antibióticos para prevenção de infecções secundárias e desbridamento cirúrgico da ferida. Em menor escala, o uso de dapsona e câmara hiperbárica para tratamento da ferida são indicados.

De acordo com recomendação do Ministério da Saúde, na segunda edição do Manual de normas e procedimentos para vacinação (2024), o soro antiloxoscélico é indicado em alguns casos de envenenamento, conforme descrito no quadro abaixo, extraído do referido manual:

## Quadro 2. Indicações de uso do soro antiloxoscélico

Gravidade do acidente	Dose
<b>Leve:</b> aranha identificada, lesão inaracterística e ausência de comprometimento sistêmico.	Tratamento sintomático. Acompanhamento de pelo menos 72 horas após a picada.
<b>Moderada:</b> lesão sugestiva ou característica (palidez ou placa marmórea menor que 3 cm em seu maior diâmetro, incluindo área de endureção), manifestações sistêmicas inespecíficas (cefaleia, febre e exantema) e ausência de hemólise.	5 ampolas (EV)
<b>Grave:</b> presença de lesão extensa (palidez ou placa marmórea maior que 3 cm em seu maior diâmetro, incluindo área de endureção), dor em queimação intensa ou presença de hemólise, independente da lesão cutânea e do tempo decorrido após o acidente.	10 ampolas (EV)

Fonte: Ministério da Saúde, na segunda edição do Manual de normas e procedimentos para vacinação (2024).

### 3.2. Uso de células-tronco mesenquimais e os seus subprodutos na medicina regenerativa e no tratamento do envenenamento por animais peçonhentos

O uso terapêutico de células-tronco (CT) tem ganhado cada vez mais espaço na medicina regenerativa, uma vez que a sua alta capacidade de proliferação e os seus componentes podem reparar ou até mesmo substituir células e tecidos lesados. Possuem potencial terapêutico as CT embriológicas (CTE), CT adultas (CTA) e CT pluripotentes induzidas (iCTP) (Kolimi et al., 2022).

Existem diferenças entre as CT, sendo divididas em três tipos principais: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As totipotentes possuem capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular, podendo dar origem a um embrião inteiro e aos tecidos extraembrionários. Esse estágio ocorre por pouco tempo, logo após a fertilização do óvulo e dura até o embrião atingir o estado de blastocisto, quando se tornam pluripotentes. Nessa fase, conseguem se diferenciar em qualquer uma das camadas embrionárias (endoderma, mesoderma e ectoderma) e são conhecidas como CTE. Após várias divisões, as células perdem a pluripotência e tornam-se multipotentes, ou seja, com capacidade de se diferenciar apenas no tipo celular do seu tecido de origem. A figura 8 mostra a hierarquia entre as CTs (Bissels et al., 2013).

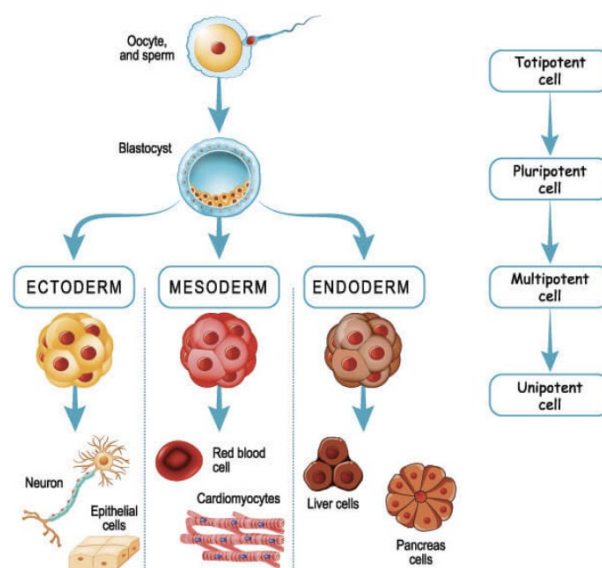


Figura 8. Desenho esquemático mostrando a evolução das células ao longo do desenvolvimento embrionário. As CT totipotentes (*totipotent cell*) estão presentes no estágio de fecundação, após contato do esperma (*sperm*) com o oócito (*oocyte*). Em seguida, torna-se um blastocisto (*blastocyst*), momento em que é pluripotente (*pluripotent cell*) e se divide nas camadas embrionárias: ectoderma (*ectoderm*), mesoderma (*mesoderm*) e endoderma (*endoderm*). Depois disso, tornam-se multipotentes (*multipotent cell*), diferenciando-se em células específicas,

como neurônios (*neuron*), células epiteliais (*epithelial cell*), células sanguíneas vermelhas (*red blood cell*), cardiomiócitos (*cardiomyocytes*), células hepáticas (*liver cells*) e células pancreáticas (*pancreas cells*), por exemplo. Nessa última fase, são chamadas unipotentes (*unipotent cell*). Fonte: biologydictionary.net.

As CTE são obtidas por isolamento da massa celular interna do blastocisto num processo que destrói o embrião em formação. Por esse motivo, é alvo de debates acerca das questões éticas que envolvem o seu uso (Kolimi et al., 2022).

As iCTP possuem morfologia celular similar à das CTA. São células reprogramadas derivadas da combinação de células somáticas de reprogramação, como Sox2, Klf4, oct3/4 e c-Myc. Conseguem se diferenciar em vários tipos celulares, como epiderme, folículos pilosos e glândulas sebáceas (Bilousova et al., 2011; Yamanaka, 2012).

Por fim, as CTA são células mesenquimais e podem ser obtidas por uma grande variedade de fontes: tecido adiposo (TA), sangue proveniente do cordão umbilical, medula óssea, fluido amniótico e geleia de Wharton. Esta última é um fluido gelatinoso presente dentro do cordão umbilical. São capazes de modular inflamação, possuem capacidade elevada de angiogênese, formam tecido de granulação, possuem efeitos antimicrobianos, estimulam fatores de crescimento e liberam citocinas. Ainda, possuem menos questões éticas associadas ao seu uso (Rasulov et al., 2005; Si et al., 2019). Também podem ser utilizadas no tratamento de envenenamentos por escorpiões, aranhas, cobras, dentre outros, que causam lesões locais, sistêmicas e podem levar ao óbito.

Além das funções bem reconhecidas de isolamento térmico e depósito de energia, o TA também possui funções endócrinas importantes no organismo (Cawthorn et al., 2012). A descoberta da leptina, primeira citocina produzida pelo TA que foi identificada, mobilizou mais estudos e identificação de outras citocinas secretadas, como adiponectina, omentina e resistina, com papel na regulação do metabolismo. Além dessas, há produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL8 e MCP-1. Acredita-se que são secretados por células que não são adipócitos, mas estão presentes no tecido (Zhang et al., 1994; Caër et al., 2017).

O TA é formado por uma população celular diversa: pré-adipócitos, CT mesenquimais (CTMs), fibroblastos, macrófagos, células T, pericitos, por eritrócitos numa rede de células estromais vasculares e por células endoteliais progenitoras. Apenas um terço dessa população é de adipócitos maduros. Quando submetido à digestão enzimática, o tecido adiposo origina

uma composição celular heterogênea de células precursoras, conhecida como fração estromal vascular (FEV) (Trevor et al., 2020).

Estudos conduzidos pela *International Federation for Adipose Therapeutics and Science* (IFATS) e pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) quantificaram a composição e proporção celular do FEV, nos quais foram identificados: 15 a 30% de células estromais; 10 a 20% de células endoteliais; 10 a 15% de linfócitos; 10 a 15% de granulócitos; 5 a 15% de monócitos; 3 a 5% de pericitos e menos de 0,1% de CT progenitoras (Kim et al., 2007). A figura 9 mostra a composição do TA e a fração correspondente à FEV.

Existem três tipos de TA no organismo humano: branco, bege e marrom. O branco é o mais abundante, encontrado no subcutâneo e perivisceral. Atua no estoque energético e liberação de ácidos graxos para o metabolismo. O bege e marrom atuam na termorregulação e possuem maquinaria semelhante para oxidação de ácidos graxos e liberação de calor. Detém quantidade elevada de mitocôndrias e vascularização. Estão presentes no pescoço, região interescapular e cavidade torácica (Dragoo et al., 2021).

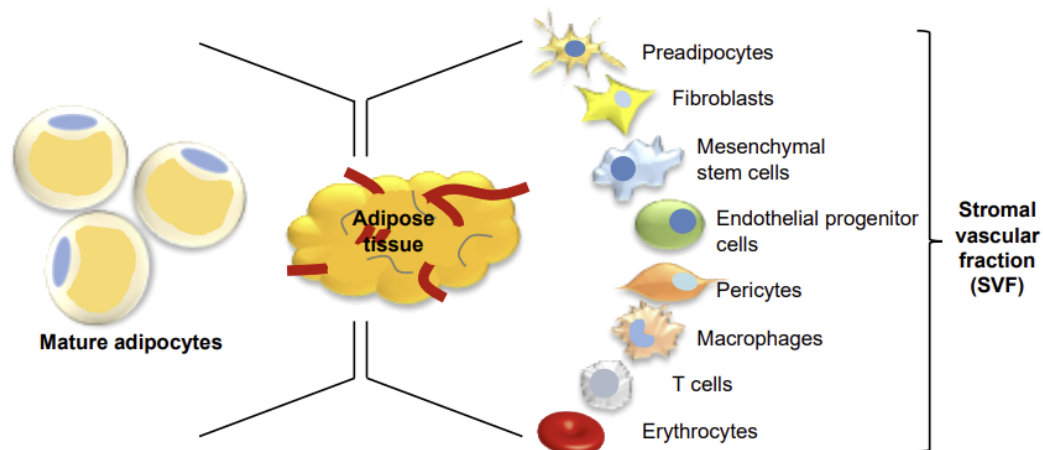


Figura 9. Composição do tecido adiposo (*adipose tissue*), dividido em adipócitos maduros (*mature adipocytes*) e células da fração estromal vascular (*stromal vascular fraction*). Dentre as células da fração estromal, estão: pré-adipócitos (*preadipocytes*), fibroblastos (*fibroblasts*), células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells*), células endoteliais progenitoras (*endothelial progenitor cells*), pericitos (*pericytes*), macrófagos (*macrophages*), células T (*T cells*) e eritrócitos (*erythrocytes*). Fonte: (Trevor et al., 2020).

O TA branco tem sido a principal fonte de CTMs. É de fácil acesso, por ser abundante no tecido subcutâneo e de fácil obtenção, uma vez que procedimentos de remoção de gordura, como a lipoaspiração, estão cada vez mais comuns e difundidos. O TA mais superficial, quando

comparado ao presente em volta dos órgãos, tem demonstrado menor potencial apoptótico e por isso é a primeira escolha para obtenção de CTMs (Trevor et al., 2020).

De acordo com Chu et al. (2019), o isolamento das CTMs provenientes de TA (Adip-CTM) é realizado por meio da digestão enzimática do TA branco, procedimento esse desenvolvido por Zuk et al. (2001). É utilizada a colagenase tipo II e são feitas lavagens sucessivas com cloreto de amônio. O material é centrifugado para remoção de adipócitos maduros, que ficam no topo do tubo. Restam uma fração líquida sobrenadante e sedimentos, que correspondem à FEV. A FEV é colocada em meio de cultura apropriado e após um período variável de uma a três semanas, dá origem a uma população homogênea de células mesenquimais (Figura 10). Existem meios de cultura apropriados para que haja diferenciação em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (Araña et al., 2013). Posteriormente, o método foi aperfeiçoado por Rapisio e Bertozzi (2017), aumentando o número de células viáveis obtidas. Métodos não enzimáticos também podem ser aplicados como uma alternativa mais barata. Contudo, não são tão eficientes como os enzimáticos (Rapisio & Bertozzi, 2017).

Existem requisitos mínimos para a célula poder ser considerada CTM, que foram estabelecidos pela ISCT em 2006. Por meio de citometria de fluxo, são identificados antígenos da superfície celular de grupamentos de diferenciação ou *clusters* de diferenciação (CD), o que permite a sua caracterização e garante que as células isoladas são Adip-CTMs e não sofreram contaminação de outros tipos celulares. CTMs obtidas do tecido adiposo devem expressar marcadores como as moléculas de adesão celular: CD29, CD44, CD146 e CD166. Receptores de moléculas como CD90 e CD105 devem estar presentes. Ainda, a célula deve ser negativa para marcadores hematopoiéticos e marcadores endoteliais. Fatores de transcrição celular são fundamentais para manter a características de divisão e devem ser identificados, como *octamer-binding transcription fator* (OCT4), *sex determining region T-box2* (SOX2), e *nanog homeobox* (NANOG) (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013).

Além dos componentes citados, outros constituintes podem ser identificados por meio de ensaios com anticorpos, ELISA e *western blotting*, que permitem a detecção de moléculas pré-selecionadas. O uso de cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem permite a identificação de novos componentes, mas existem limitações na capacidade de detectar quantidades menores de citocinas secretadas. Sugere-se a associação dos dois métodos para melhor avaliação da composição do secretoma (Sun et al., 2019).

Outra forma importante de classificar essas células é por meio do seu potencial de renovação, avaliado no meio de cultura. Essas células apresentam alta eficiência de diferenciação em outros tipos celulares de origem mesodérmica, como adipócitos, osteoblastos e condrócitos *in vitro*. Entretanto, a mesma eficácia ainda não foi identificada *in vivo* (Bunnell, 2021).

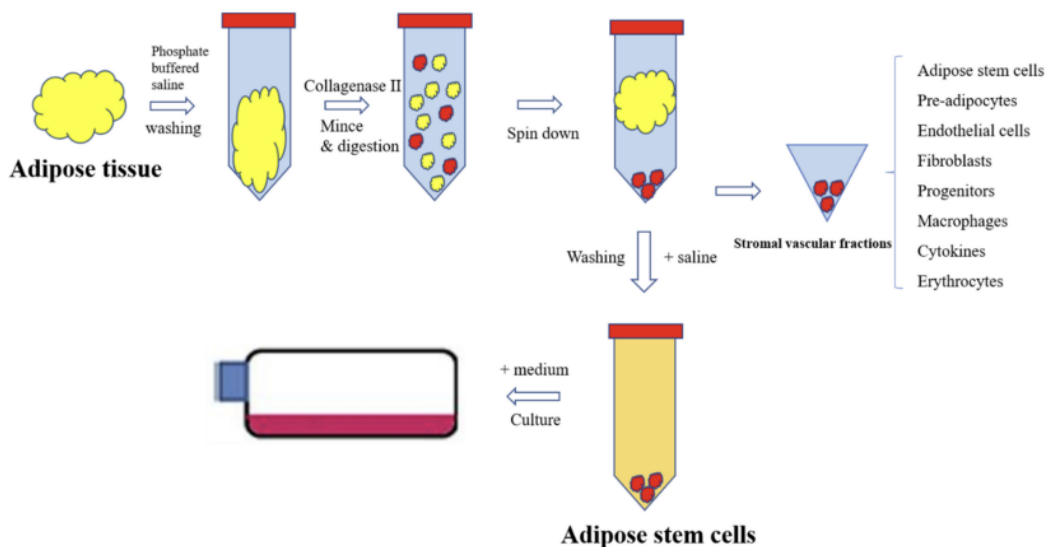


Figura 10. Etapas do processo de isolamento de CT mesenquimais a partir de tecido adiposo (TA ou *adipose tissue*). O TA passa por lavagem (*washing*) com solução salina fosfatada tamponada (*phosphate buffered saline* ou PBS). Em seguida, sofre quebra (*mince*) e digestão (*digestion*) pela colagenase II. Depois, é centrifugada (*spin down*), originando o FEV (*stromal vascular fractions*), que contém células-tronco adiposas (*adipose stem cell*), pré-adipócitos (*preadipocyte*), células endoteliais (*endothelial cells*), fibroblastos (*fibroblasts*), progenitores (*progenitors*), macrófagos (*macrophages*), citocinas (*cytokines*) e eritrócitos (*erythrocytes*). Após extração do FEV, as células-tronco adiposas são colocadas no meio (*medium*) de cultura (*culture*). Fonte: Chu et al., 2019.

As Adip-CTMs produzem inúmeros mediadores solúveis e vesículas extravasculares que podem alterar a biologia de células e tecidos com efeito terapêutico *in vivo*. Os exossomos são um tipo de vesícula extracelular. Outros tipos incluem microvesículas e corpos apoptóticos. Os exossomos são componentes extracelulares compostos por uma bicamada lipídica, possuem 30-200nm e podem ser secretados por todos os tipos celulares. A sua formação se dá a partir da invaginação da membrana endossomal, incorporação de ácidos nucleicos e proteínas do citosol e fusão do endossoma com a membrana plasmática, resultando na sua secreção (Liu et al., 2021).

Os exossomos são adquiridos a partir da ultracentrifugação das Adip-CTMs e são extraídos do sobrenadante. São considerados uma boa alternativa terapêutica pela facilidade de

obtenção, baixo custo e por reduzirem a possibilidade de rejeição do receptor. Ademais, os exossomos aceleraram o processo cicatricial em alguns estudos, promovendo migração, proliferação e síntese de colágeno (Cooper et al., 2018). No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer a sua segurança, procedimentos padrão de extração, marcadores específicos e se possui propriedades pró ou anticancerígenas (Qiu et al., 2020). Assim como os exossomos, as microvesículas parecem ter propriedades que favorecem a cicatrização de feridas, mas há poucas informações sobre a sua composição (Laberge et al., 2018).

Já o secretoma é um conjunto de fatores produzidos pelas CTs. São secretadas macromoléculas tróficas, como citocinas, quimiocinas, adipocinas, moléculas antioxidantes, fatores pró-angiogênicos, fatores antiapoptóticos, fatores de crescimento, fator neurotrófico derivado do cérebro, entre outros. Esses componentes exercem os seus efeitos benéficos por atividade parácrina. Além disso, o meio de cultura das Adip-CTMs, denominado meio-condicionado, contém esses subprodutos e é considerado como uma terapia livre de células (*cell free therapy*) (Bunnell, 2021).

O secretoma é capaz de modular a resposta imune e inflamatória, estimular a angiogênese e inibir a apoptose. No sistema imunológico, é capaz de reduzir a resposta imune exacerbada e, portanto, deletéria. Induz macrófagos ativados a expressarem um fenótipo anti-inflamatório, reduz a expressão de *natural killers*, suprime e modula a maturação de células dendríticas. Além disso, influencia positivamente na cicatrização de feridas, ao reduzir a cicatrização por fibrose e estimular a cicatrização por regeneração. Com relação aos efeitos angiogênicos, o secretoma possui substâncias como o fator de crescimento vascular endotelial e citocinas pró-angiogênicas. Já foram observados bons resultados no seu uso em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos antiapoptóticos são atribuídos a componentes como o fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento semelhante à insulina e outras citocinas, conferindo efeito citoprotetor (Sun et al., 2019). A figura 11 mostra o secretoma, os seus componentes e os principais mecanismos de ação. Ainda, de acordo com Wang et al. (2012), o secretoma consegue chegar aos tecidos lesados quando administrado por via intravenosa (IV).

O uso do secretoma traz consigo muitos benefícios, como a redução de incompatibilidade imune e atividade cancerígena; formação de êmbolos e transmissão de infecções; possibilidade de avaliar a sua segurança, dosagem e potência de forma semelhante à feita em fármacos; fácil de armazenar e manter viável; é um método econômico e pode ser

produzido em massa (Vizoso et al., 2017). Estudos corroboram a segurança do seu uso terapêutico (Lalu et al., 2012).

Considerando os aspectos citados, o secretoma tem uma vasta gama de aplicações. Há relatos de sucesso com testes em animais de laboratório (Timmers et al., 2007; Chen et al., 2012; Milan et al., 2016; Mukhamedshina et al., 2019). Também existem ensaios clínicos com seres humanos aplicados a diferentes doenças e sistemas. Há estudos com o seu uso em terapias do sistema nervoso, como em casos de acidente vascular (Lee et al., 2010) e lesões agudas da medula espinhal (Xu & Yang, 2019); doenças do sistema cardiovascular (He et al., 2020); manejo da osteoartrite (Song et al., 2018), dentre outras.

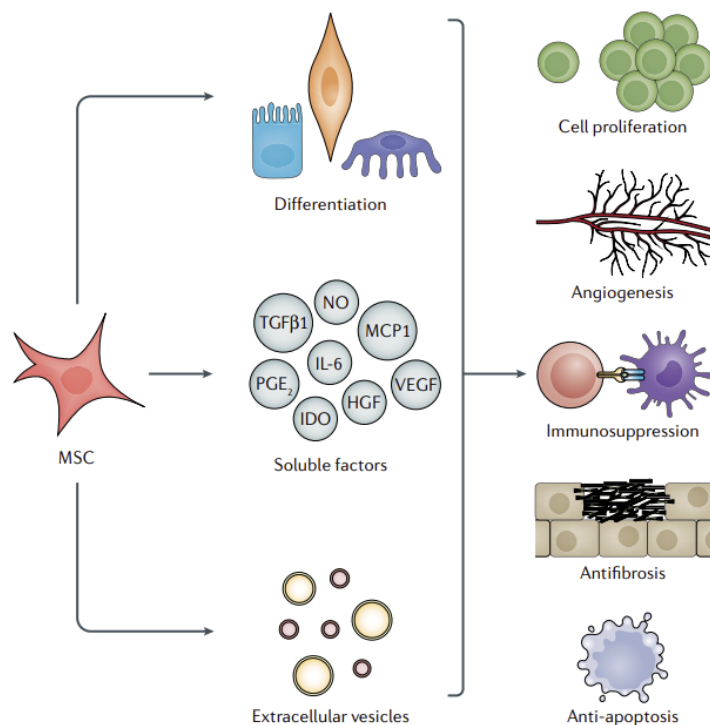


Figura 11. Secretoma, seus componentes, mecanismos de ação e efeitos celulares. Fonte: Sun et al., 2019.

Vários ensaios clínicos vêm sendo realizados com pacientes humanos, mostrando desde resultados favoráveis à ocorrência de efeitos adversos. O seu uso tem sido muito explorado no tratamento de osteoartrose. Sadri et al. (2022) aplicaram secretoma proveniente de células adiposas na articulação do joelho de três pacientes. Não foram observados efeitos adversos e os pacientes foram acompanhados por seis meses, todos com melhora clínica.

Um estudo clínico de fase IIb, realizado por Lee et al. (2019), também aplicou por via intra-articular secretoma derivado de TA autólogo. Os 12 pacientes avaliados apresentaram melhora em parâmetros clínicos, escalas de dor e exames de imagem. Já um estudo fase I/IIA, explorando o seu uso na artrite reumatoide, mostrou desfechos clínicos positivos, porém sem mudanças em parâmetros laboratoriais (Vij et al., 2022).

Pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, com nefrite refratária, receberam transplante alogênico de secretoma proveniente de TA por via sistêmica. Os doentes foram acompanhados por 12 meses e tiveram melhora significativa nos índices de proteinúria (Ranjbar et al., 2022).

Além disso, existem muitas pesquisas que focam no uso dos subprodutos de Adip-CTMs na cicatrização de feridas, em especial feridas crônicas e de difícil reparo (Kolimi et al., 2022). A sua utilização para tratamento de fístulas em pacientes portadores de doença de Crohn é um tema recorrente na literatura. Dozois et al. (2023) e Garcia-Olmo et al. (2022), em ensaios clínicos, relataram melhoras na cicatrização e resolução do quadro em alguns pacientes. Entretanto, em ambos os estudos houve relato de reações adversas graves, que não foram especificadas, em parte dos indivíduos avaliados. Sipos e Múzes (2021a) afirmam que, entre os possíveis efeitos deletérios, observam-se propriedades pró-fibrinogênicas; pró-coagulação; risco aumentado de infecção; heterogeneidade de diferenciação desfavorável e atividade pró-cancerígena. Em relação a esta última, os autores enfatizam que pode ocorrer neovascularização de neoplasia; promoção de nichos metastáticos; assim como aquisição de novas propriedades celulares do tumor, considerando a secreção e ativação de algumas enzimas. Contudo, é importante considerar que fatores como forma de obtenção e preparação do secretoma, meio de cultivo, acondicionamento, via de aplicação e sistema orgânico avaliado influenciarão nos resultados obtidos (Han et al., 2025).

Ainda focando no potencial do secretoma na cicatrização de feridas, o seu uso no manejo de acidentes causados por envenenamentos com animais peçonhentos, como cobras do gênero *Bothrops* sp. e aranhas do gênero *Loxosceles* spp., representa um campo a ser explorado. Ambos os acidentes citados são capazes de gerar necrose tecidual intensa, de difícil reparo e com sequelas funcionais (Hogan et al., 2004; Sanchez-Castro et al., 2021).

Sanchez-Castro et al. (2021) testaram os efeitos do secretoma IV em camundongos que receberam injeção intramuscular (IM) de veneno de serpente *Bothrops atrox*. O grupo tratado com secretoma diluído em *phosphate-buffered saline* (PBS) 15 minutos após o envenenamento

apresentou aumento dos níveis da enzima creatinofosfoquinase (CK), demonstrando que houve injúria muscular. Contudo, os valores dessa enzima retornaram aos registrados no grupo controle 72 horas após a inoculação do veneno, demonstrando melhoria do indicador de dano tecidual. Segundo os autores, a mudança de fenótipo dos macrófagos de pró-inflamatório para anti-inflamatório estimulada pelo secretoma é fundamental para uma boa resposta cicatricial. Além disso, os componentes do secretoma estão envolvidos em todas as fases da cicatrização, facilitando a migração para o local da ferida, estímulo à angiogênese, liberação de fatores de crescimento e citocinas e reepitelização.

### 3.3. Acoplamento-excitação-contração e potencial de ação cardíaco

Os batimentos cardíacos são fundamentais para a vida e são coordenados pelo processo de acoplamento-excitação-contração (EC). O EC é o mecanismo fundamental pelo qual os estímulos elétricos, conhecidos como potencial de ação (PA), são transformados em força mecânica, garantindo que a atividade cardíaca ocorra de forma coordenada e atenda aos requisitos energéticos do organismo (Bers, 2002).

O PA dá início à sequência de eventos que culminam na contração do músculo cardíaco. A propagação da eletricidade pelo cardiomiócito, que possui especializações relacionadas ao EC, permite a liberação de cálcio  $Ca^{2+}$ , a sua interação com o sistema contrátil e a contração mecânica. O balanço e o fluxo de  $Ca^{2+}$  são fundamentais para que o EC ocorra de adequadamente (Eisner, 2014).

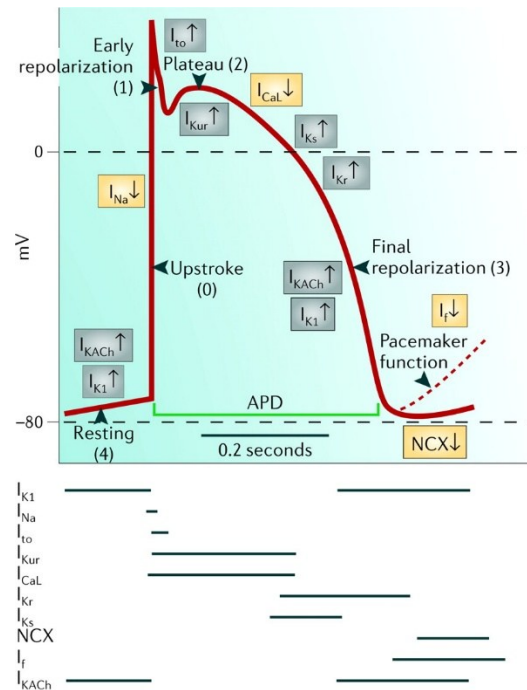
Compreender os mecanismos envolvidos no EC e no PA é de grande importância para o estudo da fisiologia cardiovascular e das desordens que ocorrem em estados patológicos. É de grande relevância o conhecimento da interdependência entre os eventos para o funcionamento cardíaco ser adequado (Pinnell et al., 2007).

Com base nos estudos publicados por Huxley e Niedergerke (1954) e por Huxley e Hanson (1954), é que foi possível o estabelecimento da teoria do filamento deslizante (*sliding filament theory*). As observações dos pesquisadores citados acima permitiram compreender que a banda A do sarcômero, região que contém filamentos de miosina, permanece com o seu comprimento constante durante a contração. Já a banda I, que contém principalmente filamentos de actina, sofre alterações no seu comprimento. O movimento da actina ao longo da miosina é capaz de produzir a contração muscular. Na presença de quantidade adequada de  $Ca^{+2}$ , a miosina consegue hidrolisar a adenosina trifosfato (ATP), permitindo a sua interação com a actina e a geração de força. (*Sliding Filament Theory, Sarcomere, Muscle Contraction, Myosin* | *Learn Science at Scitable*; Squire, 2019).

De acordo com Varró et al. (2019), a compreensão da função e regulação dos canais iônicos transmembrana e transportadores, assim como o seu impacto no PA, é essencial para o estudo de mecanismos de arritmias. A expressão de canais pode estar alterada na insuficiência cardíaca (IC), assim como em indivíduos que possuem mutações genéticas nessas proteínas.

Uma sequência elétrica normal e a contração sincrônica entre átrios e ventrículos dependem da ativação rápida de vários grupos celulares. Tal mecanismo deve responder de maneira rápida às oscilações da frequência cardíaca (FC) e do tônus autonômico. O PA preenche tais critérios

(Grant, 2009). Na figura 12, observa-se o encadeamento de eventos elétricos e as principais correntes iônicas envolvidas no processo.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 12. Correntes de membrana que geram um PA normal. Repouso (4), ascensão (0), repolarização inicial (1), platô (2) e repolarização final são as 5 fases do potencial de ação. Um declínio do potencial no final da fase 3 em células marcapasso, como o nó sinusal, é mostrado como uma linha quebrada. As correntes internas,  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca}$  e  $I_f$ , estão mostradas em caixas amarelas; o trocador sódio-cálcio (NCX) também é mostrado em amarelo. Ele é eletrogênico e pode gerar corrente interna ou externa.  $I_{KACH}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ ,  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  estão mostrados em caixas cinzas. A duração do potencial de ação (APD) é de aproximadamente 200 ms. Fonte: Grant, 2009.

A distribuição de canais iônicos não é homogênea em todo o coração. Por esse motivo, o PA sofre variações conforme a região cardíaca estudada, apresentando diferentes formatos, conforme ilustrado na figura 13 (Varró et al., 2021).

Os canais iônicos possuem duas propriedades principais: permeabilidade e *gating*. A permeabilidade diz respeito ao movimento de íons pelo canal, é seletiva e depende de fatores como o tamanho e a valência do íon. O *gating* é o mecanismo de abertura e fechamento dos canais, que pode ser voltagem-dependente, ligante-dependente e mecano-sensitivo. Os canais voltagem-dependentes mudam a sua condutância de acordo com variações no potencial de membrana (Grant, 2009).

O PA é uma mudança de voltagem causada por fluxo de íons por canais iônicos transmembrana, que possuem mecanismos dinâmicos de abertura e fechamento espontâneos. A concentração e o movimento de íons do líquido intracelular (LIC) para o líquido extracelular (LEC) são determinantes para a homeostase. A bomba de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) movimenta três íons de  $\text{Na}^+$  para o LEC e dois íons de  $\text{K}^+$  para o LIC, mantendo as cargas elétricas celulares na faixa fisiológica. O potencial transmembrana é de aproximadamente  $-90$  milivolts (mV) (Santilli et al., 2019).

Nos miócitos atriais e ventriculares, o potencial é dividido em cinco fases. É caracterizado pela fase 0, em que há abertura dos canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependentes e influxo de  $\text{Na}^+$ , o que torna a célula positiva ou despolarizada. Na fase 1 ocorre uma repolarização breve devido ao efluxo de  $\text{K}^+$  numa corrente transiente mediada por canais de  $\text{K}^+$  e inativação de canais de  $\text{Na}^+$ . Já a fase 2 ou platô é caracterizada pelo influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , que se dá principalmente por canais de  $\text{Ca}^{2+}$  lentos e efluxo de  $\text{K}^+$ . A fase 3 ou repolarização ocorre devido à abertura de diferentes canais de  $\text{K}^+$  (como correntes retificadoras rápidas e lentas e por corrente transiente) e saída desse íon para o LEC, tornando a célula negativa novamente. Na fase 4, a carga celular já voltou ao normal, sendo conhecida como fase de repouso (Nerbonne & Kass, 2005).

Nas células do nó sinoatrial (NSA) e do nó átrio-ventricular (NAV), o potencial de repouso da membrana é  $-60\text{mV}$ , não há a fase 1, e a fase 2 é mais curta e menos plana. A fase 4 é menos negativa. A fase 0 ocorre principalmente por influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  por canais lentos. A despolarização se dá de forma contínua (Koeppen & Stanton, 2009). No final da repolarização, canais hiperpolarizantes ativados por nucleotídeos (HCN) são estimulados e ativam os canais *funny* (*funny channels*), que realizam influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Além desses, o trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo T, canais sustentados de influxo de  $\text{Na}^+$  e canais receptores de potencial transiente estão presentes nas células marca-passo.

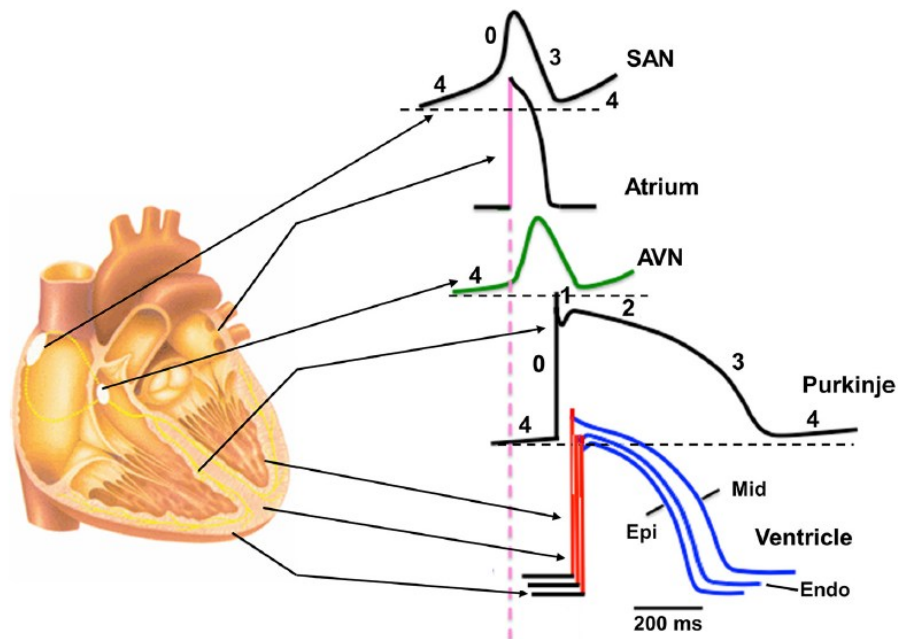


Figura 13. Diferenças regionais na configuração do potencial de ação. Observa-se o formato do potencial de ação correspondente à cada região cardíaca. NSA (Nó sinusal) ou SAN (*sinusal atrial node*). Átrio ou *Atrium*. NAV (Nó atrioventricular) ou AVN (*atrioventricular node*). Purkinje, se referindo à propagação do potencial de ação nas células de Purkinje. Ventrículo (*Ventricle*) e o formato do potencial de ação nas suas diferentes camadas (Epi para epicárdio; Endo para endocárdio e Mid para meio ou miocárdio). Fonte: Varró et al., 2021.

No quadro 3 estão descritas as principais correntes cardíacas envolvidas no PA; sua velocidade de ativação, inativação e recuperação; mecanismo de *gating* e em quais espécies estão presentes, bem como as regiões cardíacas onde são encontradas.

Com a ocorrência do PA, o  $\text{Ca}^{2+}$  entra na célula e favorece a liberação de mais  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático, num processo conhecido como liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (ou *calcium induced calcium release*, do inglês) (Ríos, 2018). A abertura de receptores de di-hidropiridina (DHPR) estimula a abertura de receptores de rianodina (RyRs) e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma. Tal fenômeno permite a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  com as proteínas contráteis e a ocorrência da contração muscular. A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  ativada pelos mecanismos explicados ou de forma espontânea (durante o repouso) é conhecida como faíscas de  $\text{Ca}^{2+}$  (ou *calcium sparks*) (Ríos, 2018).

Para ocorrer o relaxamento, a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  deve ser reduzida no sarcoplasma, o que se dá, principalmente, por quatro vias: por meio da *sarcoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA); pelo trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  do sarcolema; pela  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase do sarcolema ou por uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria. A importância quantitativa dessas rotas varia entre as espécies (Bers, 1993).

Quadro 3. Principais correntes envolvidas no PA e suas correspondentes características

<b>Tipo de canal</b>	<b>Nome da corrente</b>	<b>Ativação</b>	<b>Inativação</b>	<b>Recuperação</b>	<b>Gating</b>	<b>Espécies</b>	<b>Localização</b>
Nav	$I_{Na}$	Muito rápida	Rápida	Rápida	Voltagem	Cão, gato, humano, furão, camundongo, rato	NSA, NAV, A, P, V
Cav	$I_{Ca(L)}$	Rápida	Moderada	Rápida	Voltagem	Cão, gato, humano, furão, camundongo, rato	NSA, NAV, A, P, V
	$I_{Ca(T)}$	Rápida	Rápida	Lenta	Voltagem	Cão, gato, porquinho-da-índia, rato	NSA, NAV, A, P
Kv	$I_{to, f}$	Rápida	Rápida	Rápida	Voltagem	Cão, gato, humano, furão, camundongo, rato	A, P, V
	$I_{to, s}$	Rápida	Moderada	Lenta	Voltagem	Furão, humano, camundongo, rato, coelho	NSA, NAV, A, V
Kv	$I_{Kr}$	Moderada	Rápida	Lenta	Voltagem	Cão, gato, humano, porquinho-da-índia, camundongo, rato, coelho	NSA, NAV, A, P, V
	$I_{Ks}$	Muito lenta	Não		Voltagem	Cão, humano, porquinho-da-índia, coelho	NSA, A, P, V
	$I_{Kur}$	Muito rápida	Muito lenta	Lenta	Voltagem	Cão, humano	A
	$I_{Kslow, 1}$	Muito rápida	Lenta	Lenta	Voltagem	Camundongo	A, V
	$I_{Kp}$	Rápida	Não		Voltagem	Porquinho-da-índia	V
	$I_{Kslow, 2}$	Rápida	Muito lenta	Lenta	Voltagem	Camundongo	A, V
	$I_K$	Lenta	Lenta	Lenta	Voltagem	Rato	V

Kir	$I_{ss}$	Lenta	Não		Voltagem	Cão, humano, camundongo, rato, coelho	NSA, A, V
	$I_{K1}$				Voltagem	Cão, gato, furão, humano, camundongo, rato, coelho	A, P, V
	$I_{KATP}, I_{Kach}, I_{KATP}, I_{KP}$				ATP, Ach metabolismo, encurtamento das fibras		

Principais correntes envolvidas no PA. Nav: canal de sódio voltagem-dependente.  $I_{Na}$ : corrente de sódio. Kv: canais de potássio voltagem-dependentes. Kir: corrente retificadora de influxo.  $I_{to, f}$ : corrente transiente de efluxo rápida.  $I_{to, s}$ : corrente transiente de efluxo lenta.  $I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Kur}, I_{K}, I_{Kp}, I_{Kslow,1}, I_{Kslow,2}, I_{ss}$ : correntes retificadoras retardadas. NSA: nó sinoatrial. NAV: nó atrioventricular. A: átrio. P: Purkinje. V: Ventrículo. ATP: adenosina trifosfato. Ach: acetilcolina. Fonte: Adaptado de Nerbornne e Kass (2005) e Grant (2009).

Em coelhos, cães, humanos, furões e cobaias, 70% da redução de  $Ca^{2+}$  é feita pela SERCA e 28% é feita pelo trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$  do sarcolema. Apenas 1% é realizada pela  $Ca^{2+}$ ATPase do sarcolema e por uniporte de  $Ca^{2+}$  pela mitocôndria. Já em ratos e camundongos, 92% da redução de  $Ca^{2+}$  é feita pela SERCA e 7% é feita pelo trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$  do sarcolema. Apenas 1% é realizada pela  $Ca^{2+}$ ATPase do sarcolema e por uniporte de  $Ca^{2+}$  pela mitocôndria. Por esse motivo, ratos e camundongos mimetizam pouco o balanço de  $Ca^{2+}$  no ser humano (Bers, 1993).

A quantidade de  $Ca^{2+}$  que sai da célula durante o relaxamento deve ser a mesma que entra a cada batimento cardíaco. Caso contrário, a célula ganharia ou perderia  $Ca^{2+}$  e não estaria em equilíbrio (Eisner et al., 2017). Além das vias citadas acima, a liberação de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático e a corrente de  $Ca^{2+}$  criam *feedback* negativo para o influxo de  $Ca^{2+}$ . Quando há influxo ou liberação elevados, a entrada de mais  $Ca^{2+}$  cessa. A inativação  $Ca^{2+}$  dependente que ocorre no citosol limita a quantidade de  $Ca^{2+}$  que entra na célula durante a despolarização. Essa inativação dependente de  $Ca^{2+}$  é um efeito local mediado por calmodulina (Peterson et al., 1999).

A SERCA tem papel fundamental na contração, relaxamento e na homeostase do  $Ca^{2+}$ . Há vários subtipos e a SERCA2a é a que possui maior expressão nos cardiomiócitos. Além disso, duas proteínas estruturais estão envolvidas nos processos de ativação e inativação da SERCA2a: E1 e E2. Mudanças conformacionais nessas estruturas aumentam ou diminuem a afinidade da SERCA2a pelo  $Ca^{2+}$ . Fosfolambano é a principal proteína reguladora da SERCA2a,

inibindo sua atividade. Porém, quando é fosforilado, ele perde o seu efeito inibitório (Zhihao et al., 2020).

Quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é elevada no retículo sarcoplasmático, aumenta a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  disponível para ser liberado. Além disso, também há estímulo e aumento da sensibilidade de RyRs ao  $\text{Ca}^{2+}$ . RyRs estão associados a proteínas regulatórias do complexo juncional, como a calmodulina, e proteínas da superfície luminal do retículo sarcoplasmático, como a triadina, junctina e calsequestrina. A calmodulina se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$  e ativa vias que dependem dele. A calsequestrina atua no estoque do  $\text{Ca}^{2+}$  e funciona como um regulador da sua liberação (Wang & Michalak, 2020; Yang & Tsai, 2022).

Quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  está reduzida no retículo sarcoplasmático, a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  pode falhar em induzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, permitindo que ele se recarregue. Além disso, a redução na quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático, mesmo que localmente, pode contribuir de forma dinâmica para desligar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o EC. O conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático pode ser aumentado com o incremento do influxo pela corrente de  $\text{Ca}^{2+}$ , redução do efluxo ou aumentando a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo. Estímulo adrenérgico, aumento da frequência de estímulo, aumento da duração do potencial de ação, aumento da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  ou elevação da concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular são formas de auxiliar nessa recarga (Bers, 1993). O estiramento das fibras miocárdicas, fenômeno explicado pela Lei de Frank-Starling, contribui para aumentar a sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , assim como a cafeína e drogas inotrópicas (Fukuda et al., 2001).

O trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , em condições fisiológicas, carrega três íons de  $\text{Na}^+$  para o interior da célula e um íon de  $\text{Ca}^{2+}$  para fora. Realiza influxo ou efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pode atuar no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  quando há aumento significativo do  $\text{Na}^+$  intracelular, quando a SR  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase ou a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  estão inibidas ou se a duração do potencial de ação está prolongada (Xue et al., 2023). Esse mecanismo, assim como os citados acima, contribui para o balanço celular de  $\text{Ca}^{2+}$ , como mostrado nas figuras 14 e 15.

Os RyRs contribuem para cessar a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, por meio de inativação ou adaptação. Na inativação, os receptores só podem se abrir novamente após sua recuperação. Na adaptação, há redução da probabilidade de abertura, mas ainda podem ser reativados por concentrações elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Sipido et al., 2013). A depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático associada à inativação dos RyRs interrompe o influxo do  $\text{Ca}^{2+}$  e finaliza o ciclo de contração (Bers, 2002).

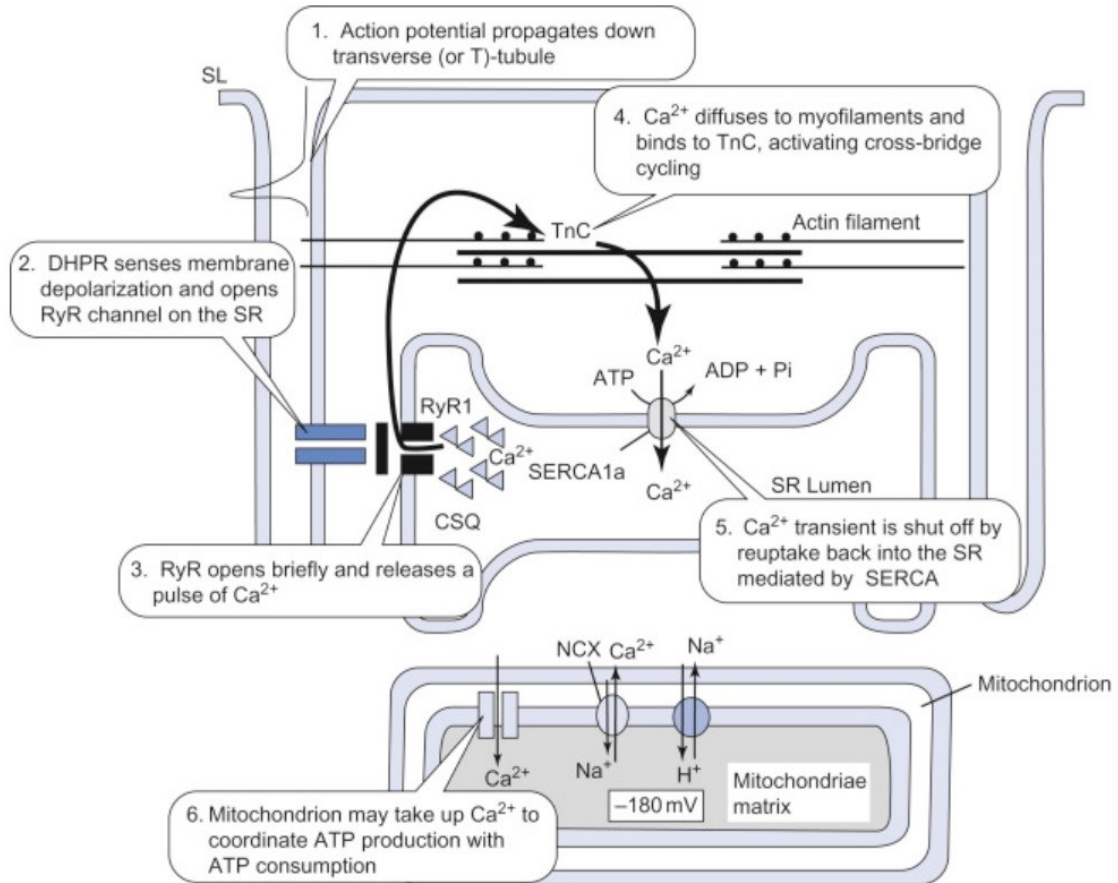


Figura 14. Desenho esquemático demonstra a sequência de eventos estimulados pelo PA. O estímulo elétrico se propaga pelos túbulos transversos em 1 (*Action potential propagates down transverse or T-tubules*). Em seguida, em 2, os DHPR são sensíveis à despolarização e estimulam a abertura de RyR no retículo sarcoplasmático (*DHPR senses membrane depolarization and opens RyR channel on the SR*). 3. RyR abrem e liberam pulsos de Ca<sup>2+</sup> (*RyR opens briefly and releases a pulse of Ca<sup>2+</sup>*). 4. Ca<sup>2+</sup> se difunde nos miofilamentos e se liga à cTnC, ativando ciclo de ligações transversais (*Ca<sup>2+</sup> diffuses to myofilaments and binds to TnC, activating cross-bridge cycling*). 5. Transiente de Ca<sup>2+</sup> é desligado pela recaptura de volta para o retículo sarcoplasmático mediada por SERCA (*Ca<sup>2+</sup> transiente is shut off by reuptake into the SR mediated by SERCA*). 6. Mitocôndria pode captar Ca<sup>2+</sup> para coordenar a produção de ATP com consumo de ATP (*Mitochondrion may take up Ca<sup>2+</sup> to coordinate ATP production with ATP consumption*). Fonte: Hu et al., 2015.

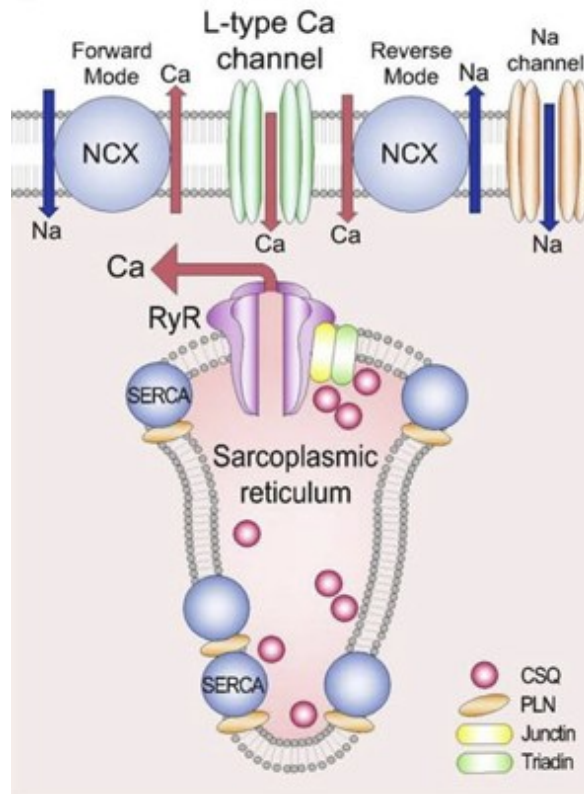


Figura 15. Desenho esquemático da díade, evidenciando as principais proteínas envolvidas no balanço de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L. (*L-type Ca<sup>2+</sup> channel*). NCX (*trocador de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>*) atuando a favor da entrada de  $\text{Na}^{+}$  na célula (no modo para frente ou, *forward mode*). NCX atuando a favor da entrada de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L na célula (no modo reverso ou, *reverse mode*). Canal de sódio (*Na<sup>+</sup> channel*). RyR (receptor de rianodina). SERCA ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático). Retículo sarcoplasmático (*sarcoplasmic reticulum*). Calsequestrina (CSQ). Fosfolambano (PLN). Junctina (*Junctin*). Triadina (*Triadin*). Fonte: Eisner et al., 2019.

O papel da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do sarcolema parece ter maior importância no controle da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o repouso do que na remoção de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula após o estímulo. Contudo, alguns trabalhos demonstram que  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pode ter potencial funcional na dinâmica do  $\text{Ca}^{2+}$  (Eisner et al., 2000).

O uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria tem um papel menor na redução da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol. Entretanto, o  $\text{Ca}^{2+}$  atua como um sinalizador para ativação de vias de produção de energia na mitocôndria, que fornece 90% do ATP utilizado pelo cardiomiócito e ocupa 30% do volume celular (Kwong, 2017).

O inositol (1,4,5) trifosfato pode induzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  em vários tipos celulares. Contudo, não parece ser o mecanismo primário nas células cardíacas. Ativação de receptores adrenérgicos e muscarínicos aumenta a produção de Inositol (1,4,5)trifosfato, evidenciando seu papel na modulação da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  em resposta a hormônios e medicamentos (Bers, 1993).

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Animais

Foram utilizadas cobaias da espécie *Cavia porcellus*, obtidas num criatório certificado em Igarapé, Minas Gerais. Um total de 28 machos, jovens e hípidos, com peso médio de 600g, foi alojado no biotério do *Multilab*, Centro de Pesquisa Multidisciplinar da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

Os animais passaram por uma quarentena e nova vermifugação antes de iniciar o experimento e ficaram sob condições ambientais controladas: temperatura de 25 °C, regime de 12h de luz e 12h de escuridão. Além disso, ração, água e feno *ad libitum*. Foi efetuada suplementação de vitamina C. Cada cobaia ficou numa gaiola individual.

O experimento obteve aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o protocolo 131/2020 (anexo A). Os animais tiveram seu bem-estar respeitado durante todo o processo de pesquisa.

### 4.2. Veneno

Foi utilizado um *pool* de veneno obtido a partir de eletroestimulação de aranhas adultas, machos e fêmeas, da espécie *Loxosceles intermedia*, fornecido pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI), no Paraná, Brasil.

Foi efetuada a dosagem proteica pelo método de Lowry (Shen, 2019), que revelou um conteúdo proteico de 1,22µg/µL. Para o desafio, foram necessários 11,4µL de veneno, diluídos em 0,5 mililitros (mL) de salina.

### 4.3. Secretoma

As Adip-CTMs foram obtidas de TA humano, que foi cultivado num meio denominado XANADU (*xeno-free and human component free*). O protocolo realizado com este meio de cultivo possui vantagens, uma vez que não é utilizado soro fetal bovino, evitando contaminações com material animal. Também é um meio livre de *Human Platelet Lysate*, o qual é pró-trombótico. Além disso, o XANADU promove rejuvenescimento das mitocôndrias.

As Adip-CTMs foram expandidas após oito passagens consecutivas a cada sete dias durante 56 dias. O cultivo manteve um tempo baixo de duplicação, entre 45 e 70h. As células mostraram características apropriadas e não havia sinais de senescência. A proliferação foi

adequada para produção em larga escala (*biobanking*), uma vez que a duplicação de sua população foi significativamente alta (25,6h) e semelhante ao obtido em meios de cultivo comerciais. Após esse processo, o secretoma foi liofilizado, o que viabilizou sua conservação e o seu transporte, sendo gentilmente fornecido pelo Dr. Juan Tejedo, do Laboratório de Biologia Molecular e Engenharia Bioquímica da Universidade de Pablo de Olavide, em Sevilha, na Espanha.

#### 4.4.Soro antiloxoscélico

Foi utilizado o soro antiloxoscélico produzido no CPPI, no Paraná, Brasil. Trata-se de uma solução composta por imunoglobulinas (Ig) específicas obtidas do plasma de animais hiperimunizados com antígeno das seguintes aranhas: *Loxosceles intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*. Cada 1,0mL é capaz de neutralizar 15 doses mínimas necrosantes (DMN), ou seja, a menor dose capaz de causar lesão dermonecrotica sem gerar óbito. Essas informações estão descritas na bula do soro.

Não há descrição da DMN em cobaias. A partir de 15,475µg são observadas infiltração de leucócitos e necrose, o que pode sugerir que a DMN seja por volta desta concentração na espécie (Fernandes, 2024).

#### 4.5.Delineamento experimental

Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos em cinco grupos, recebendo os diferentes desafios e tratamentos (Quadro 4):

##### **Grupo A**

Os animais (n=4) foram desafiados com 0,5mL de solução salina 0,9%, via intradérmica (ID), na região interescapular. Quinze minutos depois, iniciou-se o tratamento com a administração de 0,5mL de solução salina 0,9% via intraperitoneal (IP), que se repetiu nos quatro dias subsequentes, no mesmo horário, totalizando cinco aplicações.

##### **Grupo B**

Os animais (n=6) foram desafiados com 14µg de veneno de *L. intermedia* diluído em 0,5mL de solução salina a 0,9%, por via ID na região interescapular. Quinze minutos depois, iniciou-se o tratamento com a administração de 0,5mL de solução salina 0,9% via IP, que se repetiu nos quatro dias subsequentes, no mesmo horário, totalizando cinco aplicações.

### Grupo C

Os animais (n=7) foram desafiados com 0,5mL de solução salina 0,9% via ID, na região interescapular. Quinze minutos depois, iniciou-se o tratamento com a administração de 160µg de secretoma diluído em 0,5mL de solução salina 0,9%, via IP, que se repetiu nos quatro dias subsequentes, no mesmo horário, totalizando cinco aplicações.

### Grupo D

Os animais (n=5) foram desafiados com 14µg de veneno de *L. intermedia* diluído em 0,5mL de solução salina a 0,9%, por via ID na região interescapular. Quinze minutos depois, iniciou-se o tratamento com a administração de 160µg secretoma/animal, diluído em 0,5mL de solução salina 0,9% via IP, que se repetiu nos quatro dias subsequentes, no mesmo horário, totalizando cinco aplicações.

### Grupo E

Os animais (n=6) foram desafiados com 14µg de veneno de *L. intermedia* diluído em 0,5mL de solução salina a 0,9%, por via ID na região interescapular. Quinze minutos depois, iniciou-se o tratamento com uma aplicação única de 0,3mL de soro antiloxoscélico, diluídos em 0,2mL de solução salina a 0,9%, totalizando um volume de 0,5mL por via IP.

Quadro 4. Grupos / desafios / tratamentos

Grupos	Desafio	Tratamento
Grupo A	Solução salina 0,9%	Solução salina 0,9%
Grupo B	14µg de veneno de <i>L. intermedia</i>	Solução salina 0,9%
Grupo C	Solução salina 0,9%	160µg secretoma
Grupo D	14µg de veneno de <i>L. intermedia</i>	160µg secretoma
Grupo E	14µg de veneno de <i>L. intermedia</i>	Soro antiloxoscélico

Todos os animais foram avaliados diariamente e submetidos aos exames de ECG, hematológicos e bioquímicos plasmáticos.

Os ECGs foram realizados no tempo zero (T0), ou seja, antes do desafio proposto, e, aos 30 minutos, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias após desafio / tratamento.

As coletas de sangue para os exames sanguíneos foram realizadas nos tempos 48 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias após desafio / tratamento.

Um animal de cada grupo foi selecionado de forma aleatória e eutanasiado no tempo 7 dias. As células cardíacas foram isoladas para análise da contratilidade miocárdica e estudo do potencial de ação cardíaco por meio do *Patch clamp* (estudo *ex-vivo*).

Aos 14 dias (tempo 14 dias), os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento na anestesia com isoflurano.

#### 4.6. Eletrocardiograma

O ECG foi realizado *in vivo*, de forma não invasiva, com o eletrocardiógrafo INcardio X, da empresa *Impulse Animal Health* (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil).

As cobaias permaneceram em estação. O eletrodo amarelo foi posicionado no membro torácico esquerdo e o eletrodo verde, no membro pélvico esquerdo. Do lado direito de cada animal, o eletrodo vermelho foi colocado no membro torácico e o eletrodo preto, no membro pélvico (Figura 16). Dessa maneira, o ECG pôde ser estudado em seis derivações: D1, D2, D3, aVR, aVL e AVF.

Por se tratar de animais de porte muito pequeno, com peso inferior a 1,0 quilograma (kg) e tórax de tamanho reduzido, não foi possível a colocação dos eletrodos de derivações precordiais.

Não foi utilizada sedação ou anestesia para obtenção do traçado. Os registros foram gravados durante cinco minutos na velocidade 50mm/s e sensibilidade N. As gravações foram executadas nos tempos T0, 30 minutos, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias.



Figura 16. Posicionamento dos eletrodos para realização do ECG em cobaia da espécie *Cavia porcellus*. Fonte: Arquivo pessoal.

Posteriormente, foi feita mensuração da duração e amplitude das ondas, avaliação do ritmo cardíaco e da FC, no *software* próprio do INcardio X, assim como a obtenção das imagens dos traçados.

#### 4.7.Hematologia

Foi realizada coleta de 1,0mL de sangue por meio de punção da veia jugular, acondicionado em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

A avaliação hematológica foi composta por eritograma, leucograma e contagem de plaquetas. O exame foi efetuado no equipamento PochH 100i® e por contagem diferencial das células em esfregaços sanguíneos corados com kit panótico rápido (solução de triarilmetano a 0,1%; solução de xantenos a 0,1% Panótico rápido; e solução de tiazinas a 0,1%).

#### 4.8.Exames bioquímicos sanguíneos

Após a coleta de sangue e realização do hemograma e do esfregaço sanguíneo, as amostras foram submetidas à centrifugação para obtenção de plasma, que foi congelado até o término do experimento, quando foram efetuadas as análises bioquímicas de CK-MB, dosagem de cTnI e de NT-pró-BNP por meio de kits da Biocon®. Ambos são testes rápidos e quantitativos, que realizam a imunodeteção por meio de fluorescência.

#### 4.9.Avaliação anátomo-histopatológica

Após a eutanásia, os animais foram submetidos à necropsia. Foram coletados fragmentos de pele, onde foi realizada a aplicação de veneno, e de coração. Os fragmentos foram fixados em formol a 10%. Após parafinização, foram realizados cortes histológicos de 4µm de espessura, corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). Os cortes e as etapas de preparação foram realizados no Laboratório de Patologia Animal da EV- UFMG.

#### 4.10. Isolamento dos cardiomiócitos

Foi selecionado um animal de cada grupo experimental para análise da contratilidade miocárdica e do potencial de ação cardíaco por meio do *Patch clamp*. Estes foram eutanasiados com uma injeção IP de pentobarbital, na dose de 150mg/kg, no tempo 7 dias.

Os cardiomiócitos ventriculares foram isolados enzimaticamente, como descrito por Shioya (2007), com algumas modificações devido às particularidades da espécie estudada, que estão descritas a seguir.

Foi realizada a abertura do esterno e remoção do coração com instrumental cirúrgico apropriado. Em seguida, o coração ficou imerso numa solução tampão conhecida como CIB (*cell isolated buffer*, do inglês), cuja composição é: 130 milimolar (mM) de cloreto de sódio (NaCl); 5,4mM de cloreto de potássio (KCl); 0,5mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 0,33mM de fosfato monossódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); 22mM de glicose e 25mM do ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanossulfônico (HEPES). Além disso, foi adicionado ácido egtázico (EGTA) à solução, isentando a presença de cálcio nessa etapa da preparação. O coração foi então canulado por meio do tronco aórtico e colocado num sistema *Langendorff* de perfusão constante (aproximadamente 73 milímetros de mercúrio (mmHg)) e temperatura de 37°C, que permitiu a perfusão retrógrada para remoção do sangue ainda presente nas coronárias e nas câmaras cardíacas durante 5 minutos. Após isso, foi feita perfusão apenas com CIB, sem EGTA. A solução CIB contou com adição de alguns componentes: 0,1mM de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>); 0,8mg/mL de colagenase tipo II; 0,06mg/mL de proteinase tipo XXIII e 0,06mg/mL de tripsina. Finalizada a primeira fase da digestão enzimática, o ventrículo esquerdo foi seccionado, separado do restante do coração e transferido para uma nova solução CIB (sem EGTA) com a mesma composição, porém, acrescida de 0,5mM de CaCl<sub>2</sub>. O VE permaneceu nessa solução durante 7 minutos a 37°C. Após essas etapas, as células foram isoladas por leve agitação mecânica com uma pipeta de transferência. Em seguida, as células foram filtradas, centrifugadas a 100 rotações por minuto (rpm) durante 30 segundos (s), suspensas e colocadas em solução CIB com 1,2mM de CaCl<sub>2</sub> e 2mg/mL de albumina sérica bovina durante 10 minutos a 37°C. Por último, foram centrifugadas mais uma vez (a 100rpm por 30s) e mantidas numa solução Tyrode, composta por: 140mM de NaCl; 5,4mM de KCl; 0,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,33mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 11mM de glicose; 5mM de HEPES e 1,8mM de CaCl<sub>2</sub>. As células isoladas puderam ser utilizadas em até seis horas para realização dos experimentos, mantidas à temperatura ambiente.

#### 4.11. Registros da contratilidade cardíaca

Os miócitos ventriculares recém-isolados tiveram sua contratilidade avaliada por meio de detecção de bordas por uma câmera de alta velocidade NTSC (MyoCamCCD100v, IonOptix, Milton, MA, EUA). As células foram colocadas numa câmara de perfusão montada em um

microscópio invertido (Nikon TS-100, Nikon Instruments Inc, Japão). Os cardiomiócitos foram plaqueados numa lamínula acoplada à câmara, que contém um par de eletrodos paralelos. Por meio dos eletrodos, foi realizado o estímulo elétrico capaz de suscitar a contração muscular. Foi utilizado um estimulador bifásico (Grass Instruments, EUA) que gera pulsos de 80 volts (v) e 4 milissegundos (ms) de duração. A frequência de estimulação variou de 1 a 3 Hertz (Hz). As células ficaram imersas em solução de Tyrode, à temperatura ambiente, durante o período da análise.

A partir das imagens obtidas, foi possível medir o encurtamento celular após o estímulo elétrico usando um sistema de vídeo detector de bordas (IonOptix. Milton, MA, EUA) calibrado para a objetiva utilizada.

#### 4.12. *Patch clamp*

Os cardiomiócitos provenientes do ventrículo esquerdo recém-isolados foram transferidos para uma câmara de registros e banhados com solução de Tyrode padrão. A câmara de registros contendo as células foi fixada à mesa de um microscópio invertido (Axiovert 100 M, Zeiss, Alemanha). Foi utilizado um amplificador de *patch-clamp* (EPC 9.2; HEKA Instruments, Germany) para a medida de potenciais transmembrana nos cardiomiócitos isolados, tendo como referência um eletrodo de Ag/AgCl imerso na câmara contendo as células isoladas, o qual foi conectado ao amplificador via *headstage*. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se a configuração de *whole-cell current-clamp* para medir os potenciais de ação. As micropipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 1-2M $\Omega$  (megaohm). Após o estabelecimento da configuração *Whole-cell*, as células foram mantidas em repouso por um intervalo de 3-5 min, de modo a permitir que o meio intracelular se equilibrasse com a solução contida na micropipeta (em mM: 20 KCl, 130 ácido aspártico, 130 de hidróxido de potássio (KOH), 10 HEPES, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 NaCl, 4 ATPNa<sub>2</sub>). O potencial hidrogeniônico (pH) foi ajustado para 7,2 com KOH. Os transientes capacitivos foram anulados em todos os experimentos. Células com resistência em série superiores a 5 M $\Omega$  não foram utilizadas durante as análises.

Os PAs foram obtidos a partir de um potencial de membrana livre e não clampeado (equivalente ao potencial de repouso da própria célula após a diálise da solução de pipeta com o meio intracelular), utilizando frequência de estimulação de 1Hz. Os primeiros 50 a 100 PAs foram gravados para verificar a estabilização da forma de onda do PA. Em ambos os protocolos

os potenciais foram deflagrados por meio de pulsos com amplitude de 0,7 a 1 nanoampere (nA) e duração variável entre 3-5 ms. A frequência de aquisição do sinal digital foi de 10 quilohertz (kHz).

#### 4.13. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, os dados obtidos foram apresentados na forma de médias e desvio-padrão. Em relação às variáveis quantitativas, foi feito teste de normalidade de distribuição (Kolmogorov-Smirnov), seguido de teste de análise de variância (ANOVA) e Tukey ( $p < 0,05$ ). Em caso de não normalidade, foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas de Dunn. Os dados foram avaliados por meio do *GraphPad Prism 9*. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Seleção dos animais e das doses utilizadas

Cobaias da espécie *Cavia porcellus* são utilizadas como modelos experimentais há muitos anos. Trata-se da espécie que reproduz melhor o quadro de loxoscelismo sistêmico (Fernandes, 2024) principal motivo pelo qual foi escolhida. Além disso, são animais de fácil manejo e possuem muitas características anatômicas e fisiológicas que os tornam adequados para o estudo de diversas patologias. São usados em modelos de doenças infecciosas, estudos reprodutivos e cardiopatias (Padilla-Carlin et al., 2008; Chorro et al., 2009; Guo et al., 2009; Taylor & Lee, 2012). Além disso, é um modelo reconhecido em estudos eletrofisiológicos, compartilhando características similares a correntes elétricas e PA cardíaco humanos (Joukar, 2021).

A dose de veneno selecionada foi baseada no estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa (Fernandes, 2024), no qual a aplicação intradérmica de 14µg do veneno de *L. intermedia* em cobaias foi capaz de gerar alterações eletrocardiográficas sem ocasionar o óbito dos animais. Sendo assim, essa dose foi selecionada a fim de reproduzir os efeitos cardíacos e permitir a avaliação dos animais por mais tempo.

Foi realizada a eletroforese em gel poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS) para melhor compreensão e caracterização das proteínas presentes no veneno, demonstrada na Figura 17. Ao lado, está o peso molecular das bandas padrão. Observa-se, no pool de veneno utilizado nesse experimento, predominância de proteínas com massa molecular entre 50 e 25kDa, evidenciando uma concentração maior de fosfolipases, metaloproteases e hialuronidases.

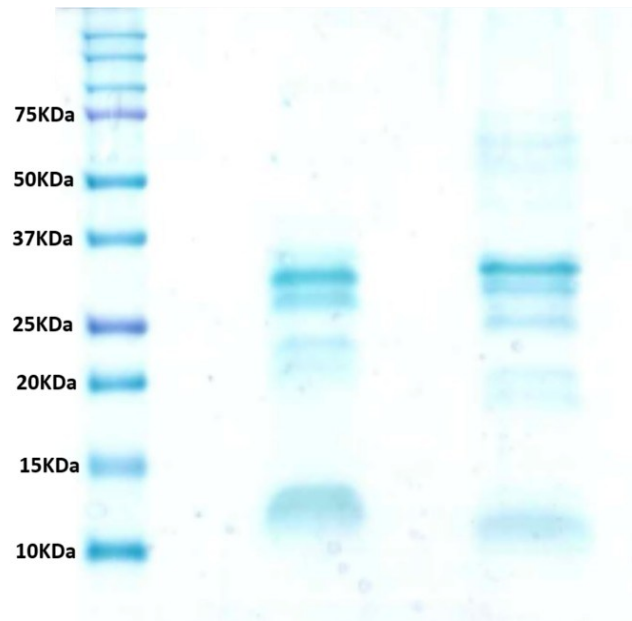


Figura 17. Eletroforese SDS-PAGE do veneno de *Loxosceles intermedia* utilizado, em duas diferentes concentrações, e os valores de massa molecular da banda-padrão.

A dose do soro antiloxoscélico foi determinada de modo a neutralizar 2 DMNs, considerando que a quantidade de veneno aplicada foi inferior à possível DMN da espécie. Foi feita a extrapolação para a espécie *Cavia porcellus* e a dose de veneno utilizada.

A dose do secretoma foi escolhida com base em estudos prévios realizados por Sanchez-Castro et al. (2021) e Rodrigues et al. (2024). O experimento de Sanchez-Castro et al. (2021) utilizou uma única dose de 50µg de secretoma em camundongos desafiados com veneno de *Bothrops atrox*. Já o trabalho de Rodrigues et al. (2024) utilizou 60µg de secretoma para tratar a dermonecrose induzida pelo veneno de *L. intermedia*. Considerando que o objetivo do trabalho foi tratar o quadro sistêmico e mimetizar um tratamento semelhante aos realizados com anti-inflamatórios comerciais, foi preconizada uma dose maior, que foi de 160µg, em cinco aplicações.

## 5.2. Eletrocardiograma

Os seguintes parâmetros foram avaliados de forma quantitativa no ECG das cobaias: eixo da onda P, eixo do complexo QRS, duração da onda P, amplitude da onda P, intervalo PQ, duração do QRS, duração do intervalo QTc e FC. A avaliação qualitativa foi realizada na classificação do ritmo cardíaco e na identificação de arritmias.

Para fins de comparação, foram utilizados os valores de referência de ECG de cobaias propostos por Botelho et al. (2016), conforme descrito no Quadro 5.

Quadro 5. Valores de referência dos parâmetros eletrocardiográficos de *Cavia porcellus*

<b>Parâmetro</b>	<b>Intervalo de referência</b>
P (ms)	30 - 60
P (mV)	0,04 – 0,24
PQ (ms)	41 - 110
QRS (ms)	41 – 91,3
QRS (mV)	0,07 – 1,03
T (mV)	0,03 – 0,13
QT (ms)	85,7 – 158,7
FC (bpm)	191,7 - 381

O eixo elétrico da onda P é a medida do sentido da despolarização atrial. O cálculo desse parâmetro foi feito como proposto por (Santilli et al., 2019):

$$Eixo\ de\ P = Arcan \times \frac{2 \times PavF}{\sqrt{3} \times Pdl}$$

*PavF* e *Pdl* representam a amplitude da onda P nas derivações aVF e D1.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ao longo de toda a avaliação, evidenciando que o eixo da onda P não foi afetado pelo envenenamento loxoscélico ou pelos tratamentos aos quais os grupos foram submetidos (salina 0,9%, secretoma e soro antiloxoscélico), como mostrado na figura 18. A figura 19 mostra a variação nos valores da onda P dentro de um mesmo grupo experimental.

Dessa forma, infere-se que a geração do impulso elétrico no NSA e sua propagação pelos tratos internodais e feixe de Bachman se mantiveram preservados, considerando o veneno, sua dose, bem como as demais drogas e as doses aplicadas.

Há poucas informações na literatura sobre valores de referência do eixo elétrico da onda P em cobaias. Kijtawornrat et al. (2011) calcularam o potencial gerado pelo coração na superfície corpórea de cobaias saudáveis. Contudo, os pesquisadores utilizaram derivações semi-ortogonais e vetorcardiograma para esse cálculo, o que poderia gerar viés na comparação. Dessa maneira, esse parâmetro foi avaliado apenas comparando seu valor ao longo do tempo, sem correlação com outros estudos.

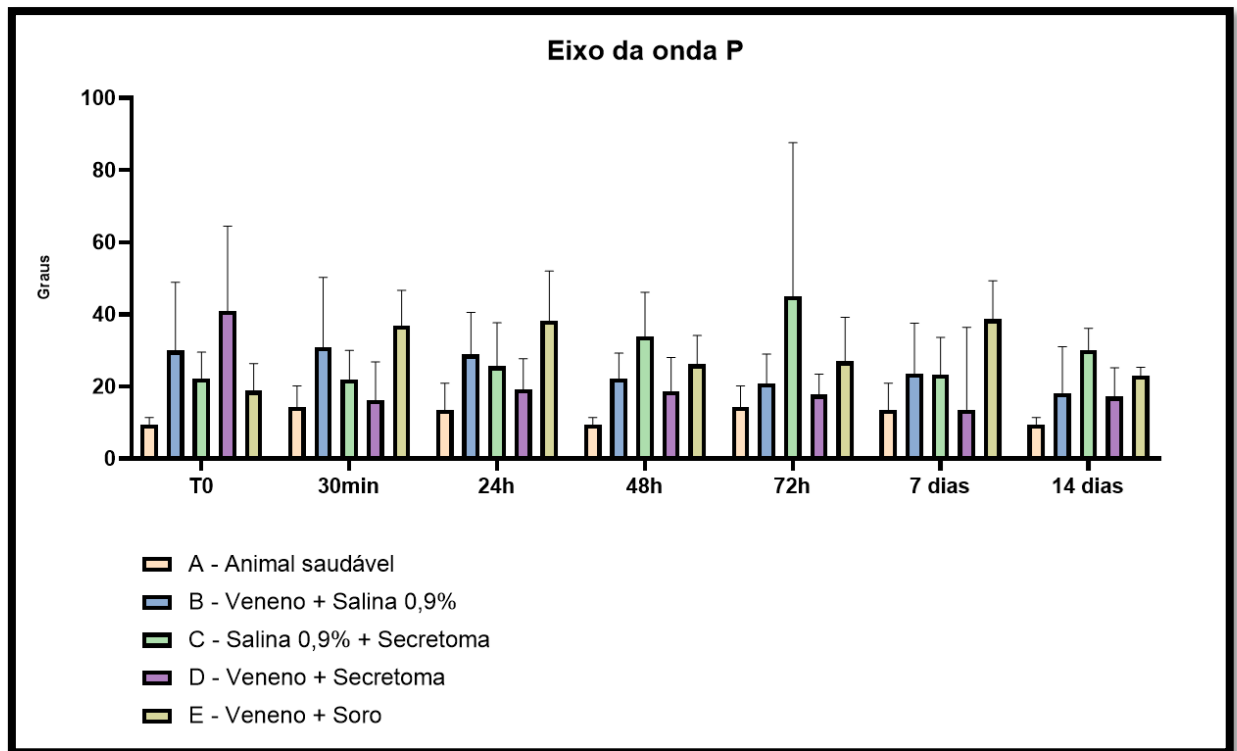


Figura 18. Valores médios do eixo da onda P nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Nível de significância estabelecido:  $p < 0,05$ .

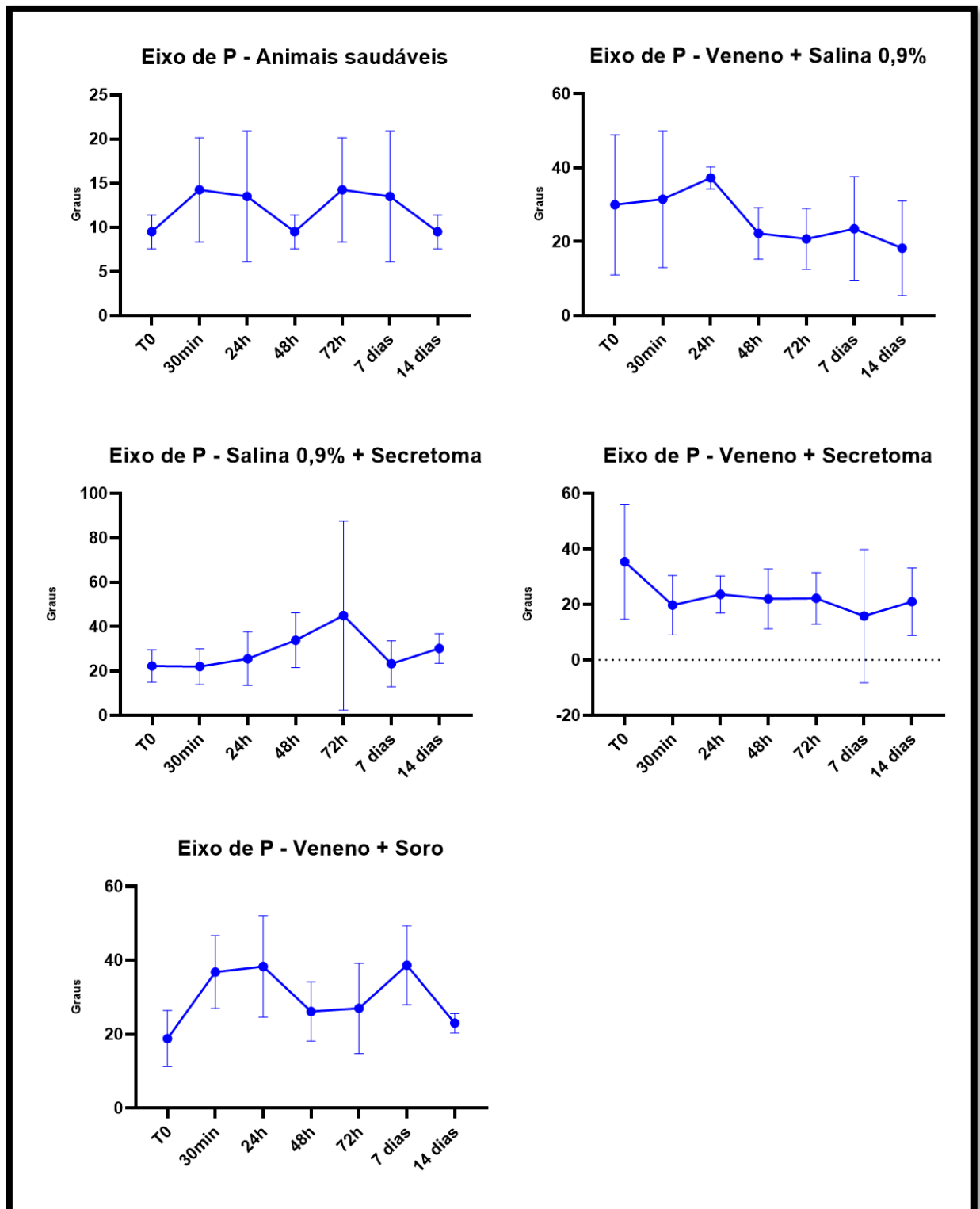


Figura 19. Valores médios do eixo da onda P em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Nível de significância estabelecido:  $p < 0,05$ .

Além do eixo da onda P, a sua duração e amplitude também foram avaliadas nos diferentes grupos ao longo do experimento. A duração da onda P reflete o tempo necessário para a despolarização dos átrios direito e esquerdo (Chen & Soliman, 2019). Já a sua amplitude reflete o grau de remodelamento eletromecânico atrial, caso exista, e o padrão de condução interatrial (Park et al., 2016).

É possível observar a comparação da duração e da amplitude da onda P entre os grupos nas figuras 20 e 21, respectivamente. Já o comportamento do parâmetro em cada grupo está ilustrado nas figuras 22 e 23.

Com relação à duração da onda P, foi observada diferença significativa entre o grupo B e o grupo C. E, entre o grupo B e o grupo E, no tempo 72h. A duração da onda P foi maior no grupo desafiado com solução salina 0,9% e tratado com secretoma e no grupo desafiado com o veneno de *L. intermedia* e tratado com soro antiloxoscélico quando comparados ao grupo desafiado com veneno de *L. intermedia* e tratado com solução salina a 0,9%.

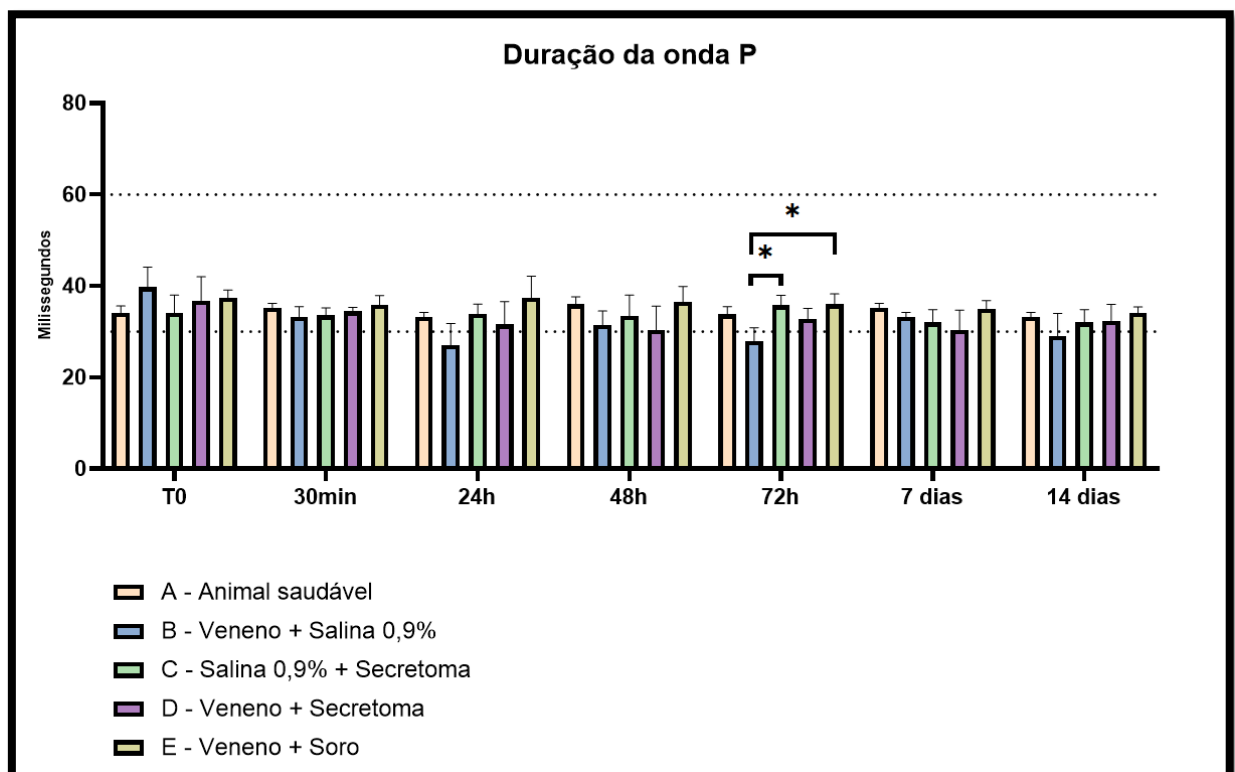


Figura 20. Valores médios da duração da onda P nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\*:  $p < 0,05$ .

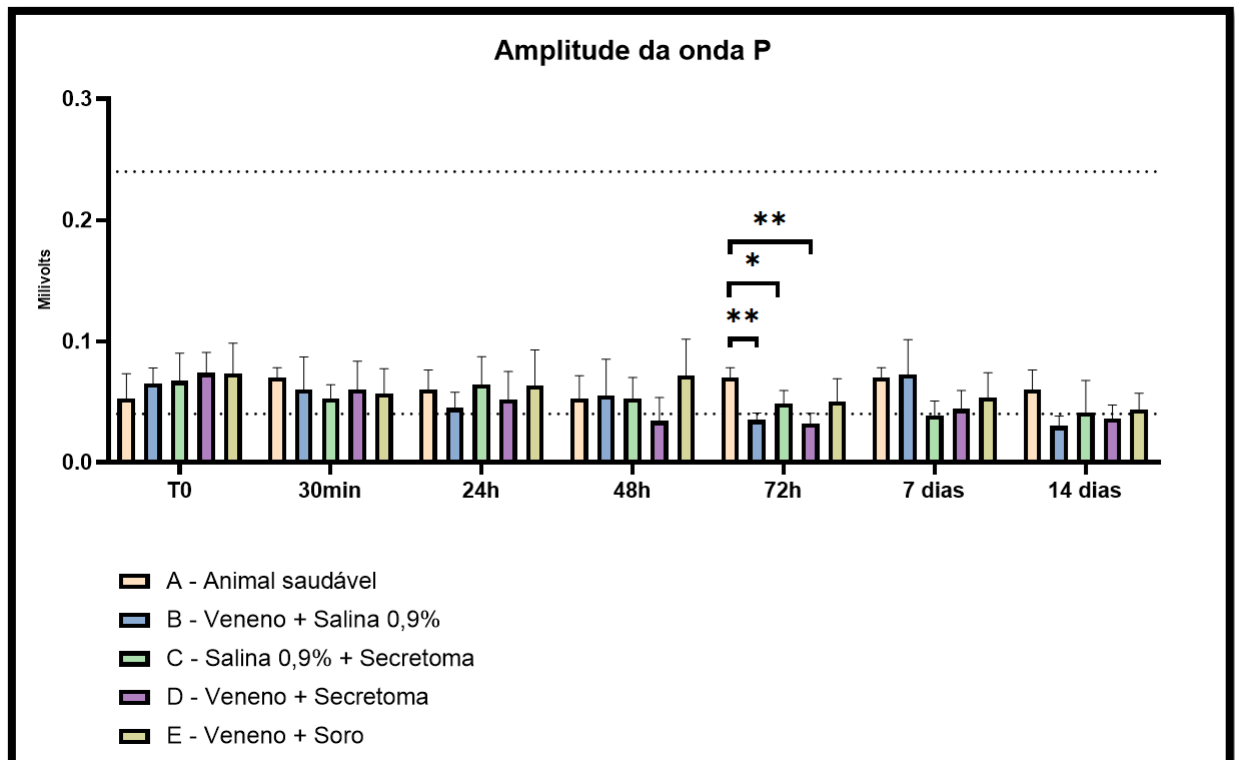


Figura 21. Valores médios da amplitude da onda P nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

No grupo B, observa-se que o valor médio da duração da onda P foi inferior ao intervalo de referência da espécie, o que pode indicar um efeito significativo do envenenamento (Figura 20). No mesmo tempo (72h), houve diferenças na amplitude da onda P entre os diferentes grupos. Pode-se observar que as menores amplitudes ocorreram nos grupos B e D, respectivamente, ficando claro que o secretoma não pôde reverter a ação do veneno loxoscélico sobre a diminuição da amplitude da onda P (Figura 21). Percebe-se que os valores encontrados ficaram abaixo dos valores de referência da espécie (delimitados pelas linhas pretas pontilhadas no gráfico), o que pode significar um impacto real sobre este parâmetro.

No tempo 72h, ainda se observam efeitos importantes do veneno, que interferiu na duração da onda P. Já o uso do secretoma e do soro antiloxoscélico foram capazes de manter a duração de P dentro da normalidade para a espécie. Com relação à amplitude de P, o uso do secretoma como forma de tratamento do envenenamento não neutralizou a redução na amplitude de P.

Quando a duração da onda P foi avaliada em cada grupo ao longo do tempo, não houve diferença significativa, como mostrado na figura 22. Já na comparação da amplitude da onda P

(Figura 23), foi observada diferença entre os indivíduos do grupo D. Observa-se uma redução progressiva da amplitude de P e o valor médio do grupo ficou abaixo da normalidade para a espécie nos tempos 48h e 72h. Após esse tempo, os valores retornaram para o intervalo de referência.

Deve ser ressaltado que, às 72h, observam-se efeitos importantes do veneno, que interferiram na duração e amplitude de P. O uso do secretoma e do soro antiloxoscélico mantiveram a duração de P dentro da normalidade para a espécie. Com relação à amplitude de P, o uso do secretoma como forma de tratamento do envenenamento não neutralizou a sua redução.

É denominado intervalo PQ o tempo entre o início da onda P e o início do complexo QRS, refletindo a condução intra-atrial e o retardo do impulso elétrico no NAV. Sua avaliação é relevante para diagnóstico de anormalidades na condução intra-atrial e de patologias do NAV (Toman et al., 2020). A figura 24 mostra a comparação deste intervalo entre os grupos experimentais ao longo do tempo. Já a figura 25 mostra o comportamento do intervalo PQ em cada grupo experimental.

Embora tenha sido identificada diferença entre os grupos B e E, no tempo 72h, os valores do intervalo PQ se mantiveram dentro da normalidade para a espécie (Figura 24). Na figura 25 é possível observar que o intervalo PQ tem redução progressiva até tempo 48h nos grupos B e D. A partir do tempo 72h, os valores sobem e se estabilizam. Nos demais grupos, o intervalo PQ se mantém praticamente constante. Tendo isso em vista, percebe-se um efeito do veneno no intervalo PQ e este efeito não foi suplantado pelo tratamento com o secretoma. Ainda que os valores tenham se mantido no intervalo de referência, suas oscilações podem ser significativas quando se pensa num indivíduo envenenado, que pode ter esse parâmetro afetado.

A diferença entre o grupo B e o grupo E no tempo 72h pode ser em decorrência da variação de PQ no grupo envenenado, que reduziu ao longo do tempo, e que não experimentou mudanças no grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxoscélico. Sendo assim, supõe-se que o soro mitigou os efeitos do veneno em relação ao intervalo PQ. Já o tratamento com secretoma intensificou tais efeitos, uma vez que as cobaias envenenadas e tratadas com secretoma apresentaram redução progressiva de PQ, que perdurou no grupo até o tempo 14 dias. Ação do veneno, processo inflamatório e alterações na condução causadas pelo secretoma são as principais hipóteses para o observado.

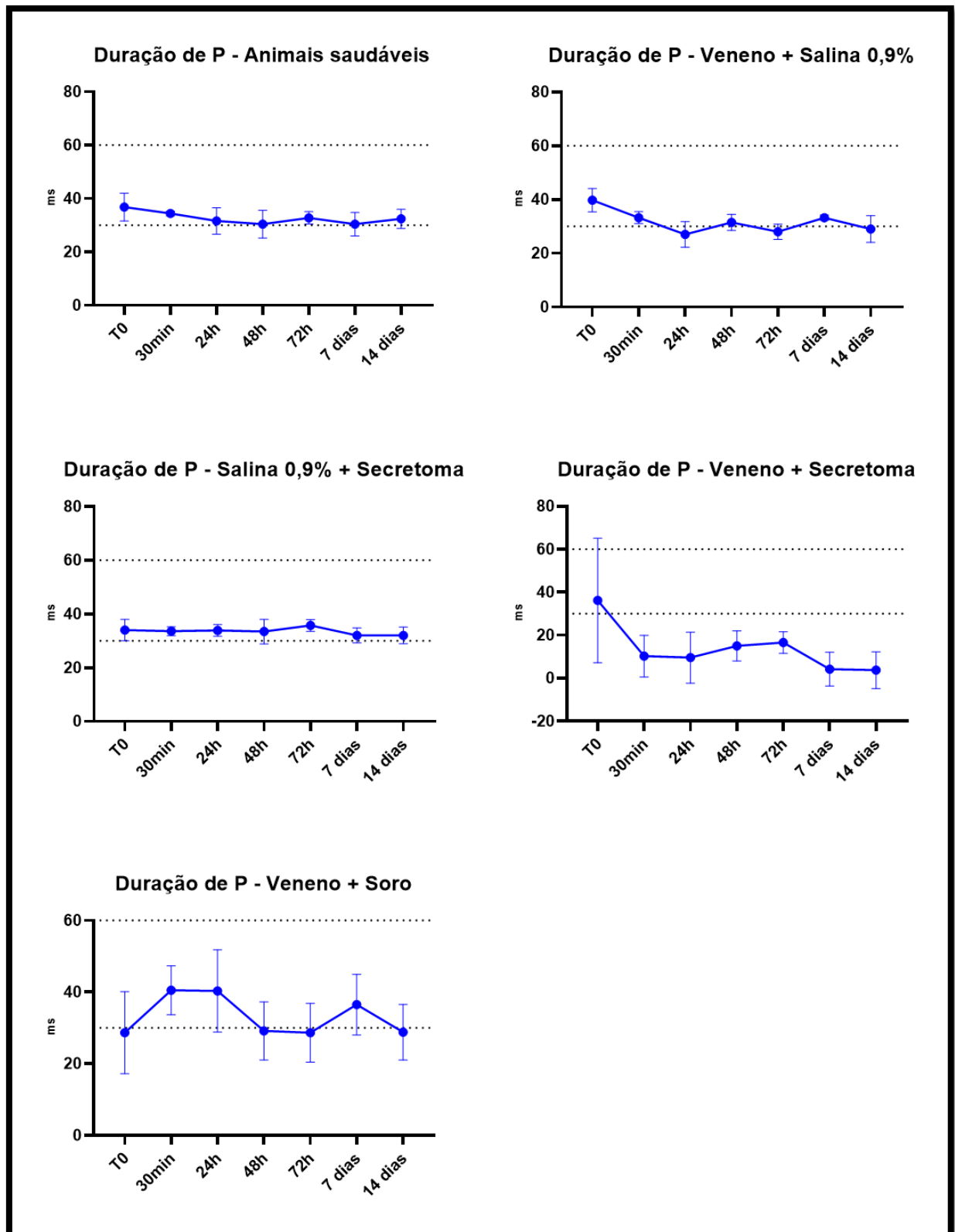


Figura 22. Valores médios da duração da onda P em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

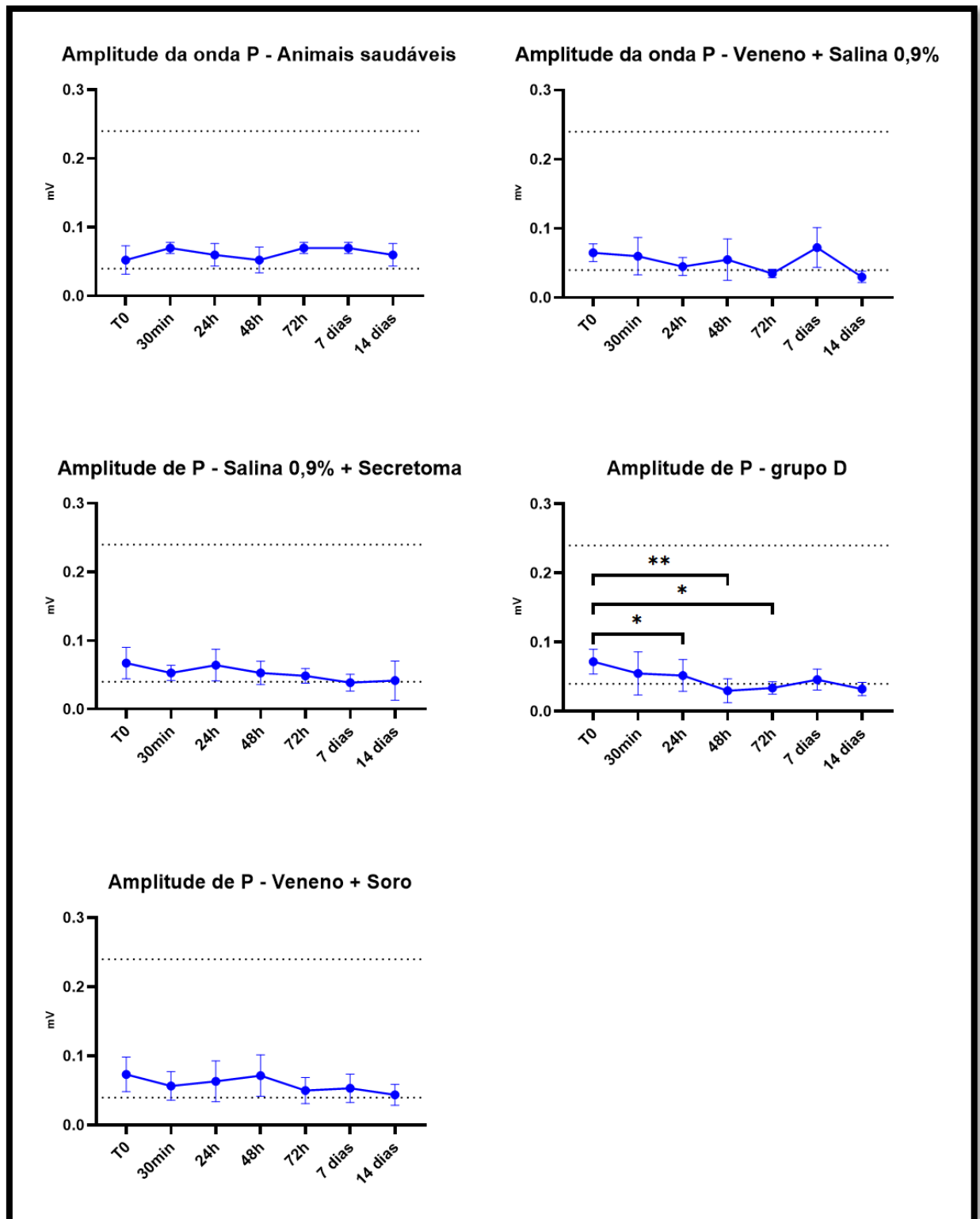


Figura 23. Valores médios da amplitude da onda P em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

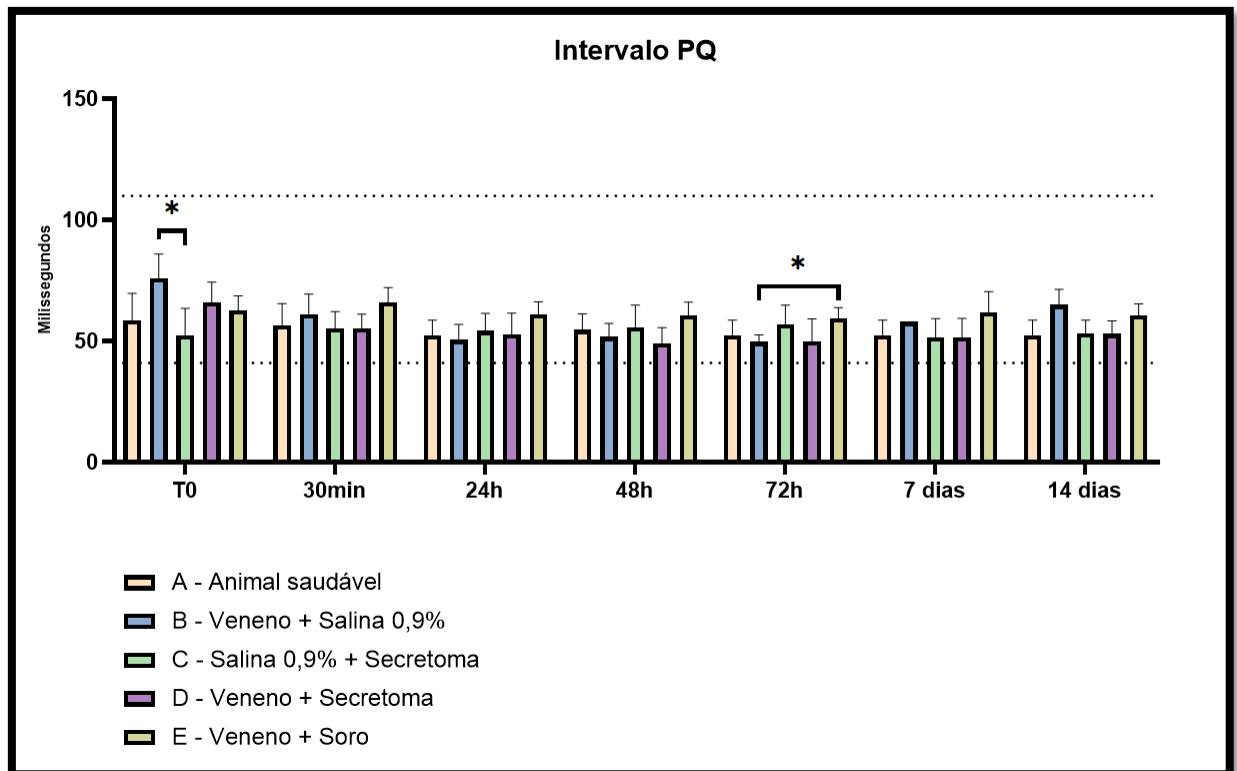


Figura 24. Valores médios da duração do intervalo PQ nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.  
\*  $p < 0,05$

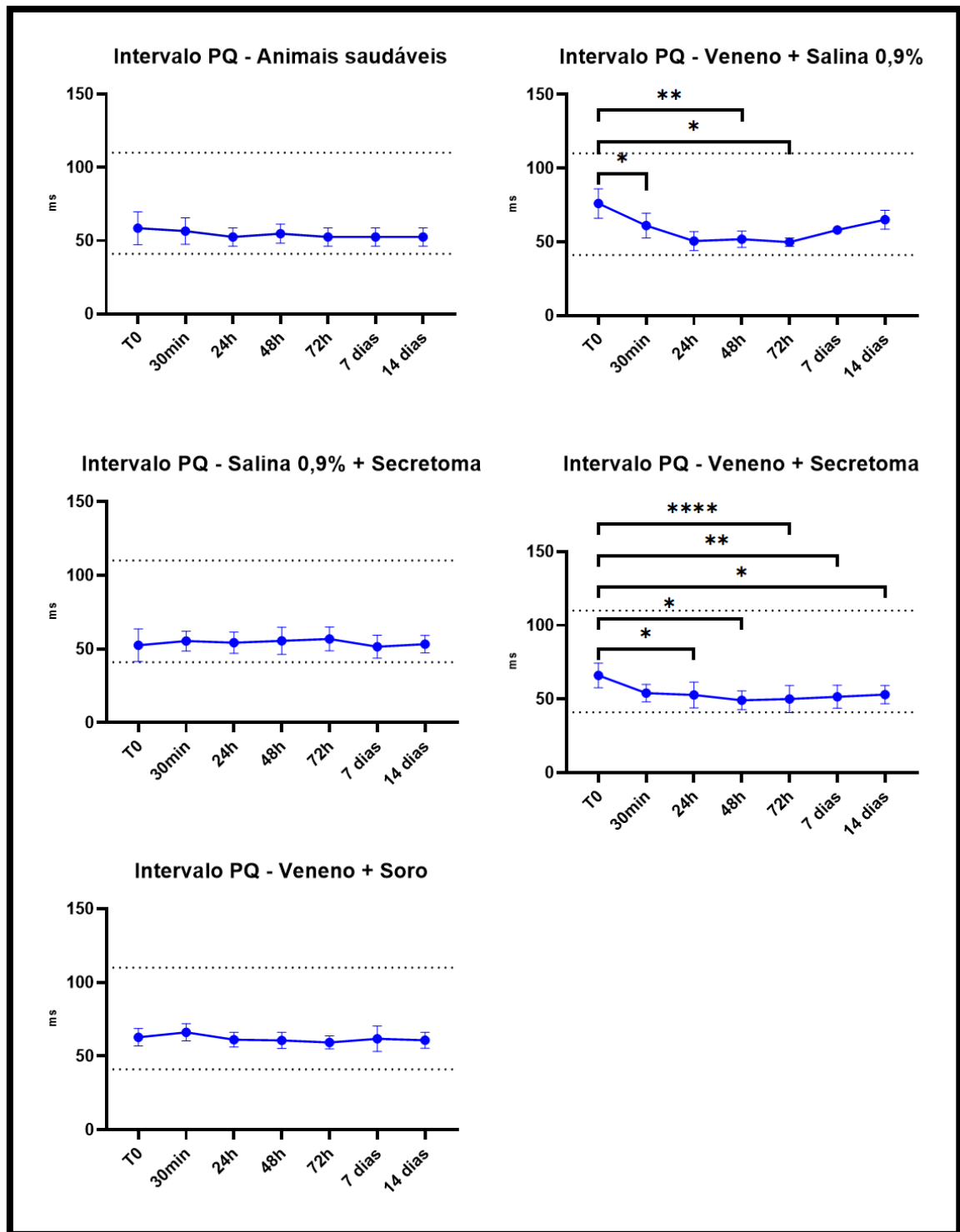


Figura 25. Valores médios da duração do intervalo PQ em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

Foi possível perceber que o efeito do veneno ao longo do tempo reduziu o intervalo PQ de significativamente. Sabe-se que a diminuição de PQ, também conhecida como pré-excitação ventricular, está associada à maior ocorrência de eventos arrítmicos, uma vez que pode acontecer condução anterógrada rápida de taquiarritmias atriais por via acessória, culminando em fibrilação ventricular e morte súbita (Cohen & Triedman, 2014). Diante disso, pode-se chegar à conclusão de que o envenenamento loxoscélico, ao longo do tempo, pode favorecer a pré-excitação ventricular e seus possíveis desfechos negativos.

O eixo do complexo QRS, também conhecido como eixo elétrico médio do coração, representa o sentido da despolarização que ocorre nos ventrículos ao longo do ciclo cardíaco. É um parâmetro de grande relevância no ECG, uma vez que pode auxiliar na detecção de hipertrofia, distúrbios de condução e a origem de arritmias (Dahl & Berg, 2020).

O eixo do complexo QRS foi calculado como proposto por Santilli et al. (2019):

$$\text{Eixo do QRS} = \text{Arcan} \times \frac{2 \times (\text{QRSmáx em aVF} - \text{QRSmín em aVF})}{\sqrt{3} \times (\text{QRSmáx em D1} - \text{QRSmín em D1})}$$

QRSmáx e QRSmín, na fórmula, representam os valores máximo e mínimo de amplitude do complexo QRS nas derivações aVF e D1.

Os valores obtidos do eixo do QRS estão na figura 26, mostrando a comparação entre os grupos ao longo do tempo.

Não foi observada diferença entre os grupos, durante o tratamento e acompanhamento, em relação ao eixo do QRS (Figura 26). Entretanto, quando foi avaliado o comportamento do eixo em cada grupo (Figura 29), observou-se diferença significativa no grupo que foi envenenado e tratado com soro antiloxoscélico, entre T0 e o tempo 30min, com aumento significativo do valor do eixo, conforme mostrado na figura. Dessa forma, para um indivíduo envenenado e tratado com soro antiloxoscélico, a mudança no eixo cardíaco pode ser relevante. A oscilação no eixo do QRS identificada no grupo E, de um valor médio de 14° para 40°, demonstra um desvio à direita. Esse desvio ocorre principalmente por hipertrofia ventricular direita (Dahl & Berg, 2020) e pode estar associado à baixa perfusão coronariana (Wang et al., 2018). O sinergismo entre veneno e soro ou a ação do soro pode ter sido responsável pela variação observada, uma vez que o veneno isoladamente não provocou tal alteração. A reação

inflamatória causada por ambos ou em maior escala pelo soro são as principais hipóteses para o resultado obtido. De qualquer maneira, foi uma reação rápida, por ocorrer após 30min de envenenamento, e transitória, uma vez que não foi encontrada nos demais tempos estudados.

Nas figuras 27 e 28, estão evidenciadas as variações na amplitude e na duração do complexo QRS entre os diferentes grupos ao longo do experimento.

Não houve diferença entre os grupos experimentais em relação à amplitude do complexo QRS (Figura 27). Quando avaliado em cada grupo experimental (Figura 30), foram observadas diferenças significativas. Entretanto, os valores se mantiveram dentro da normalidade para a espécie. A amplitude do QRS pode variar ao longo da vida e sofre interferência de características individuais (Hannibal, 2014), o que também pode justificar os achados obtidos. Além disso, de acordo com Detweiler (2010), a amplitude do QRS varia entre 0,82 e 2,63mV em cobaias. Os valores obtidos ao longo do experimento foram compatíveis com os encontrados por Botelho et al. (2016) e foram inferiores a 0,8mV em praticamente todos os animais estudados nos diferentes grupos. Isso sugere que pode existir uma variação maior desse parâmetro na população geral.

O grupo B apresentou redução da amplitude do QRS entre os tempos zero e 72h, o que diferiu do grupo A. Sendo assim, pode ter havido um efeito do veneno neste parâmetro, mas que não foi suficiente para gerar variações muito expressivas nos valores obtidos.

A mudança de amplitude registrada pode se dever a variações individuais dos animais estudados, uma vez que a redução de voltagem pode ser detectada, em menor proporção, em indivíduos saudáveis (Pelliccia et al., 2024). Ainda, situações de estresse, mais reconhecidas na medicina como a síndrome de Takotsubo, podem ser responsáveis por atenuação do QRS (Guerra et al., 2015). Embora as condições de estresse sejam minimizadas, não deixam de ocorrer totalmente durante a experimentação, o que pode ter afetado as cobaias. Também é importante lembrar que o ambiente de laboratório pode favorecer o desenvolvimento de pneumonia intersticial em animais imunocompetentes (Yasuda et al., 2022). Doenças respiratórias podem afetar a dispersão do estímulo elétrico cardíaco (Valentini et al., 2022).

A redução de amplitude do QRS no grupo B foi entre o T0 e 72h, o que diferiu das variações nos animais saudáveis, que foram nos tempos 48h e 7 dias em relação ao T0. Tal diferença pode sugerir um possível efeito isolado do veneno, num mesmo indivíduo, capaz de atenuar a voltagem do QRS. Ação direta do veneno no miocárdio, gerando inflamação e edema nas fibras, é uma hipótese provável. Pneumonia e efusões também devem ser consideradas. O

grupo D pode ter sofrido de efeitos do veneno e da ação do secretoma, que pode modular a resposta inflamatória e interferir na condução cardíaca, como já foi discutido. Foram observadas lesões cardíacas relevantes na histopatologia dos animais do grupo B, demonstrando que o veneno danificou o tecido miocárdio e deflagrar nele uma inflamação. O secretoma, em menor proporção, causou danos ao tecido cardíaco, o que pode justificar seus efeitos nos grupos que os receberam, que apresentaram arritmias e lesões, mas em menor intensidade e quantidade.

Foram identificadas diferenças entre os grupos em relação à duração do QRS (figura 31). No grupo E, observou-se diferença entre os T0 e 48h. Contudo, trata-se de oscilações pequenas e que não desviaram dos valores estabelecidos para a espécie.

O aumento de duração do QRS se correlaciona com alterações na condução intraventricular, indicando sobrecargas e/ou distúrbios de condução, comumente referidos como bloqueios. Também se correlaciona com redução da fração de ejeção, maior risco de arritmias e maiores taxas de mortalidade (Guglin & Curtis, 2013). Já a sua redução tem pouco significado e se correlaciona com melhores desfechos clínicos (Borgquist et al., 2016; Berger et al., 2023). Sendo assim, as variações observadas têm baixa relevância.

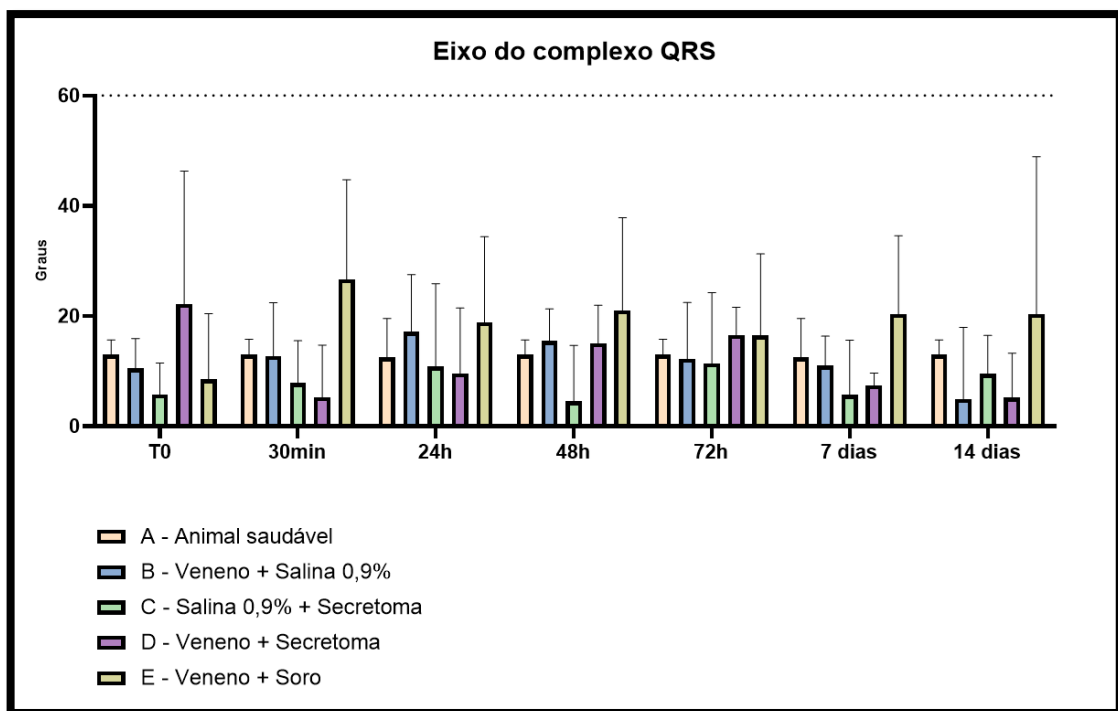


Figura 26. Valores médios do eixo do QRS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

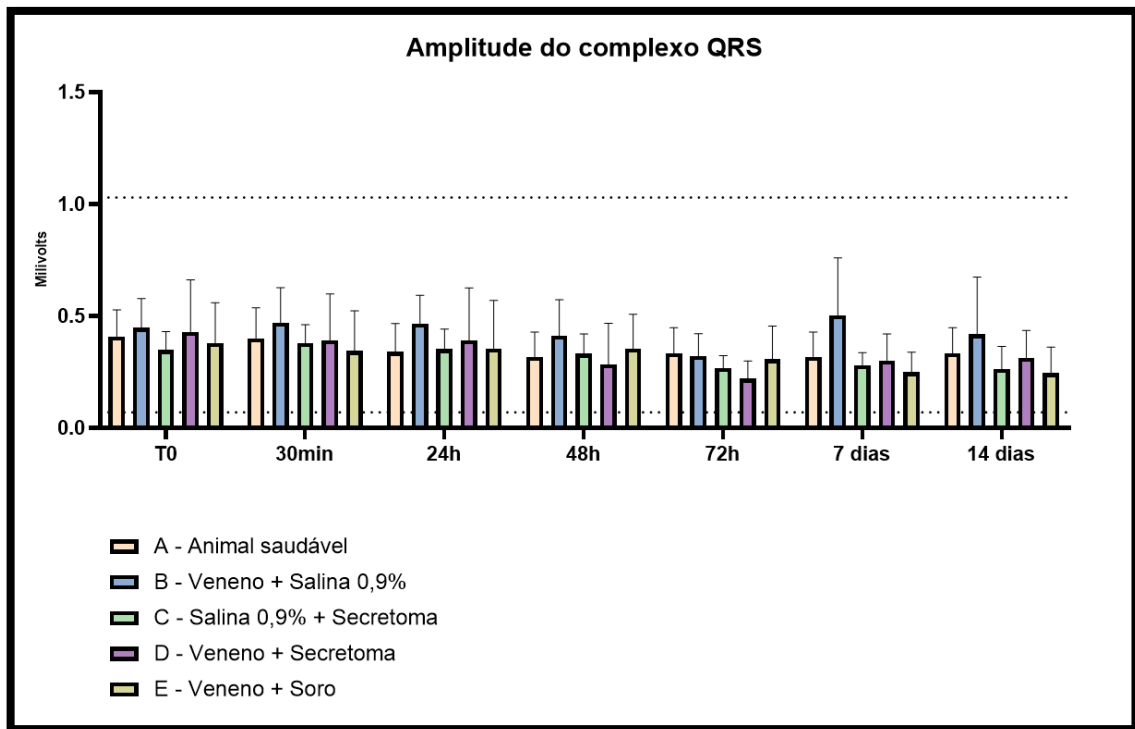


Figura 27. Valores médios da amplitude do QRS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie. \* $p < 0,05$ .

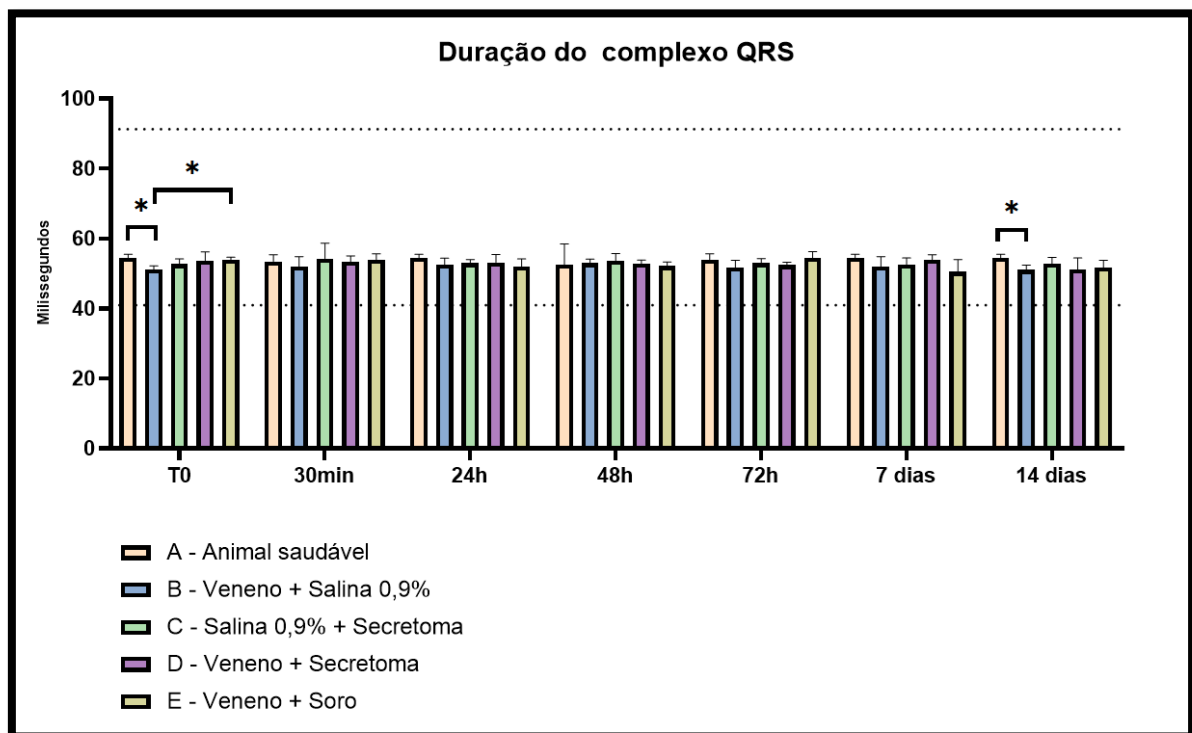


Figura 28. Valores médios da duração do complexo QRS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie. \* $p < 0,05$ .

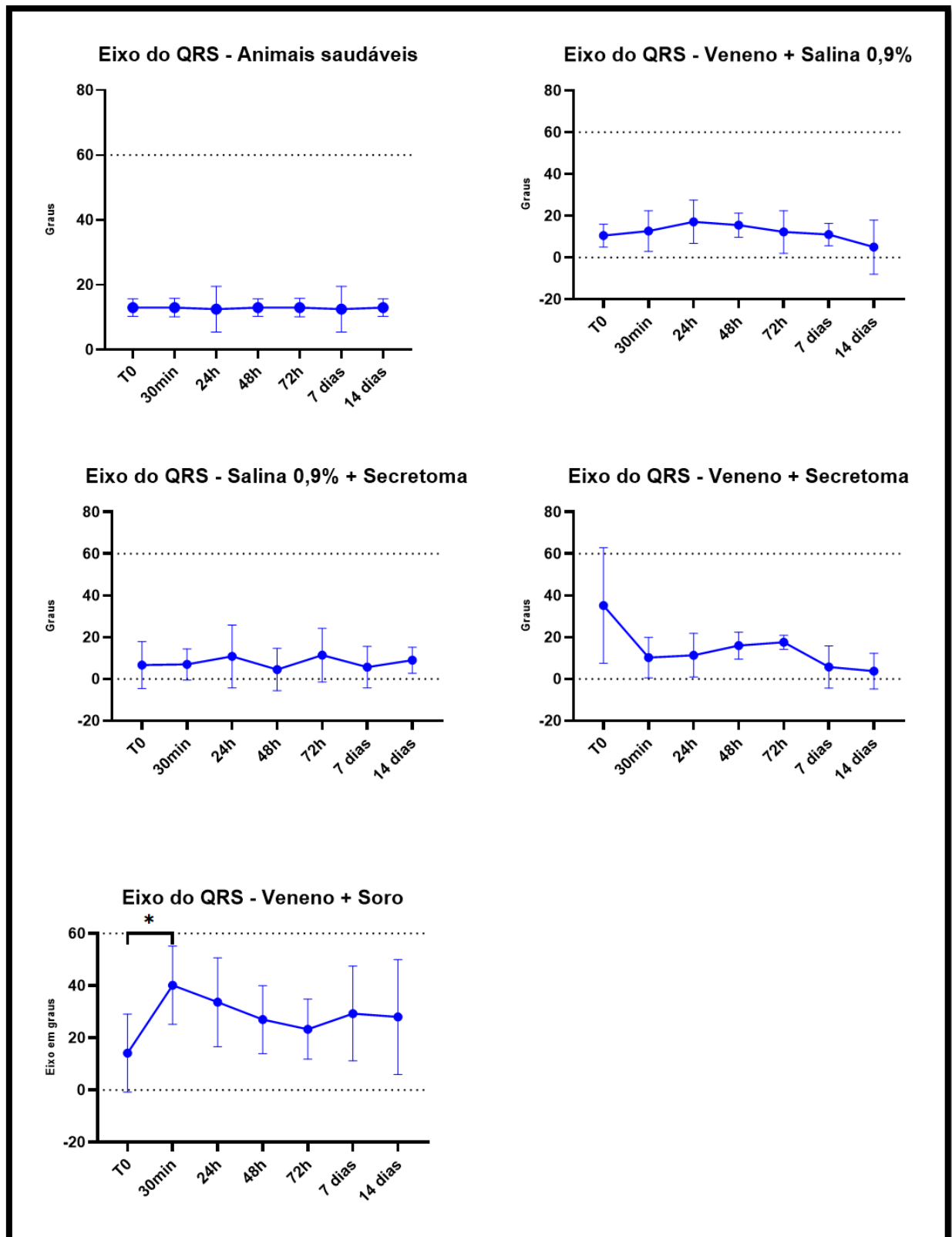


Figura 29. Valores médios do eixo do QRS em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* p < 0,05

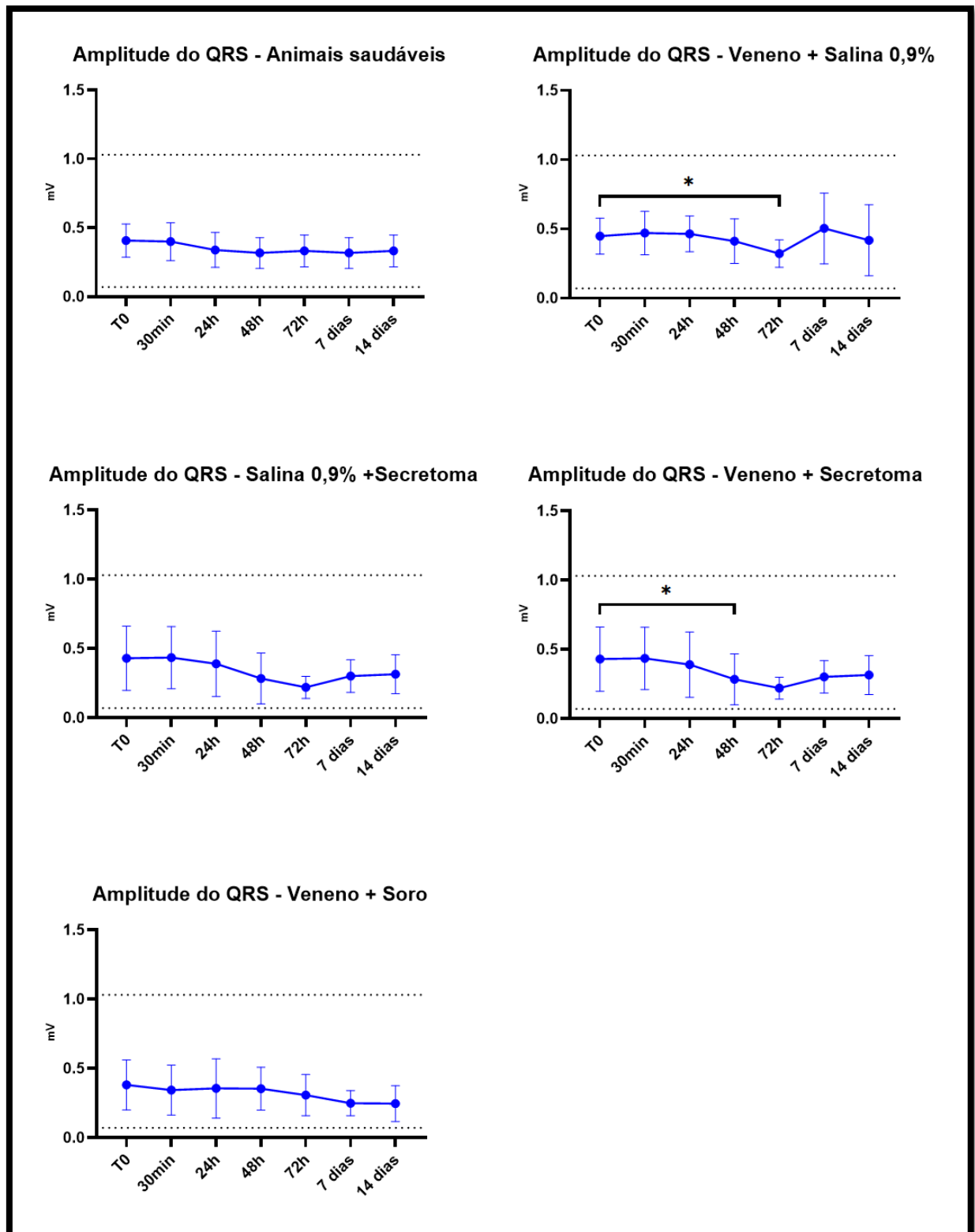


Figura 30. Valores médios da amplitude do QRS em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\*  $p < 0,05$

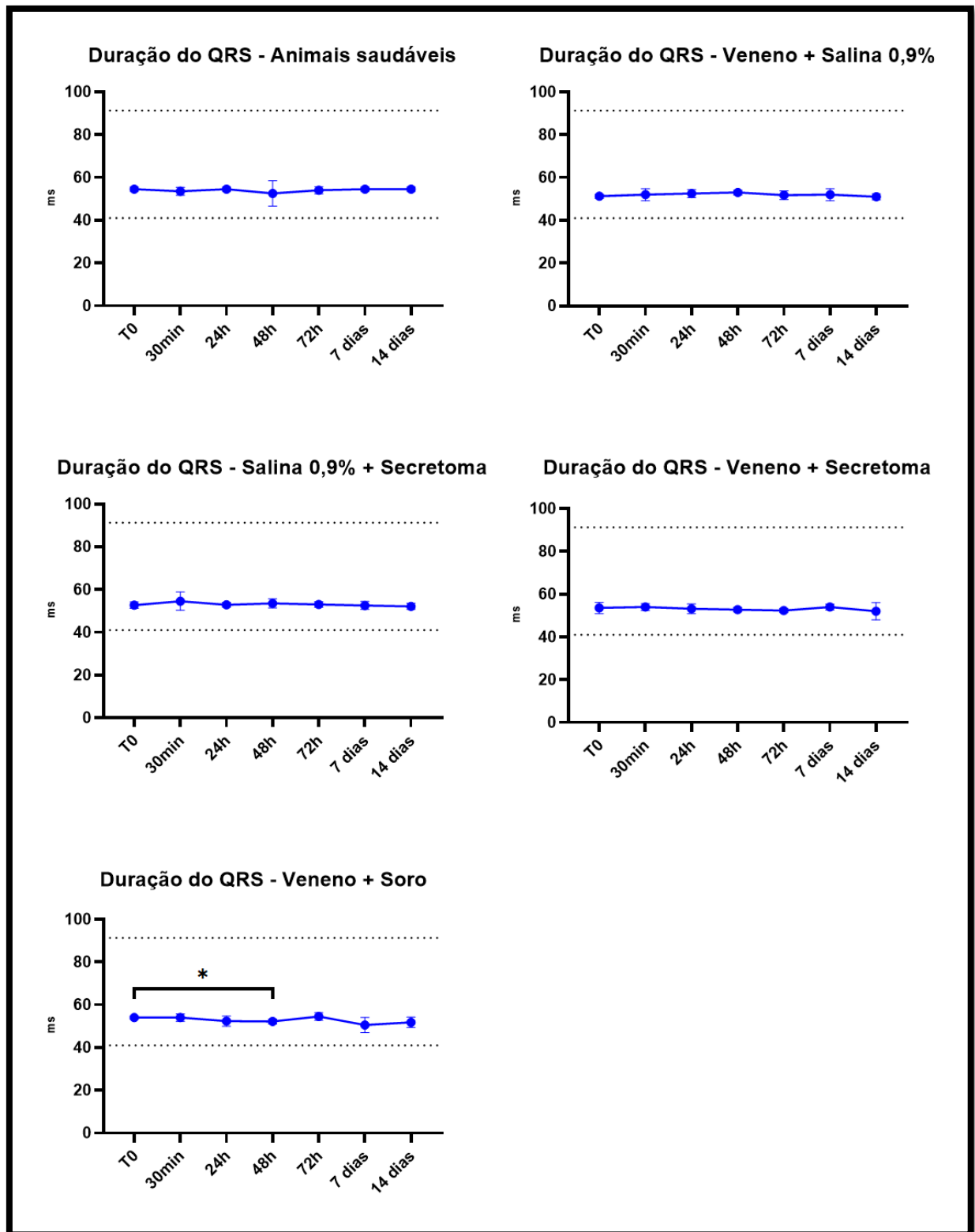


Figura 31. Valores médios da duração do QRS em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\*  $p < 0,05$ .

Por último, foi feita avaliação do intervalo QTc e da FC das cobaias, nos diferentes grupos, ao longo do experimento. O intervalo QT representa o tempo entre a despolarização e a repolarização ventricular. Seu prolongamento ou redução se correlaciona com risco elevado de arritmias graves e morte súbita. O intervalo QT é afetado por vários fatores, mas a FC é o mais importante deles. Existem diversas fórmulas para calcular o intervalo QT corrigido (QTc), ajustando o seu valor à FC. A aplicabilidade dessas fórmulas é controversa e, por vezes, é difícil determinar a mais adequada (Yu et al., 2022). De acordo com Botelho et al. (2016), a fórmula de Van der Water (QTcV) é a mais consistente para correção do intervalo em cobaias, com alto valor de correlação (correlação de Pearson). Considerando isso, essa foi a fórmula utilizada, descrita abaixo:

$$QTcV = QT - 0,087 \times \left\langle \frac{60}{FC - 1} \right\rangle$$

Outros fatores capazes de prolongar ou reduzir o intervalo QT são as canalopatias hereditárias (as quais são mutações genéticas), anormalidades de eletrólitos, uso de medicamentos e anestésicos, isquemia, acidose, deficiências nutricionais, entre outros (Tse et al., 2017).

Oscilações na FC sofrem influência de processos fisiológicos e patológicos. O controle da FC ocorre por mecanismos intrínsecos, como a automaticidade e variações na condução elétrica cardíaca; e por mecanismos extrínsecos que envolvem os efeitos do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, barorreceptores e quimiorreceptores (Armstrong et al., 2022). Com relação a processos patológicos, IC, inflamações sistêmicas e infecções são exemplos (Nanchen et al., 2013; Williams et al., 2019).

Os resultados da comparação de QTc e FC, figuras 32 e 33, serão discutidos em conjunto, considerando a correlação entre os dois parâmetros.

Ao comparar o gráfico do intervalo QTc ao gráfico da FC, observa-se que, mesmo quando não há diferença estatística, as oscilações do QTc são inversamente proporcionais à FC (Malik et al., 2002). Dessa forma, percebe-se a correlação entre os dados, justificando variações entre os grupos.

O aumento de FC nos animais desafiados com veneno e tratados com salina 0,9% sugere interferência do envenenamento nesse parâmetro, provavelmente por estresse orgânico e exacerbação de resposta inflamatória. Assim, há um consequente impacto no QTc. Da mesma

forma, valores inferiores de FC nos demais grupos certamente impactaram no seu intervalo QTc. Ademais, efeitos do envenenamento capazes de gerar estresse orgânico, inflamação, interferir na permeabilidade e integridade vascular podem ter afetado de forma direta ou indireta o intervalo QTc. Tal ação pode ter sido suplantada pelo uso do soro antiloxoscélico.

É importante ponderar que variações na FC e QTc, com ou sem diferenças estatísticas, podem ser relevantes quando se pensa do ponto de vista clínico, em que pequenas mudanças podem ser significativas para um indivíduo e não serem para outro.

Quando realizada a comparação do QTc em cada grupo experimental (figura 34), houve diferença no grupo E entre os T0 e 48h. De toda maneira, a variação foi pequena e se manteve dentro da normalidade para a espécie. A comparação da FC em cada grupo experimental (figura 35) mostrou resultados significativos em B e E. Em ambos, a FC aumentou significativamente do T0 ao tempo 14 dias, influenciando o QTc. No grupo E, as variações podem ser decorrentes da FC ou de ação isolada do veneno, soro ou de ambos.

É importante mencionar que o pH e os eletrólitos das cobaias não foram avaliados durante o experimento. Logo, a influência desses fatores no QTc e FC não foi considerada.

Por último, foi realizada avaliação da amplitude da onda T, que corresponde à fase rápida da repolarização ventricular (Hanna & Glancy, 2011). Não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 36) ou entre indivíduos de um mesmo grupo neste parâmetro (Figura 37).

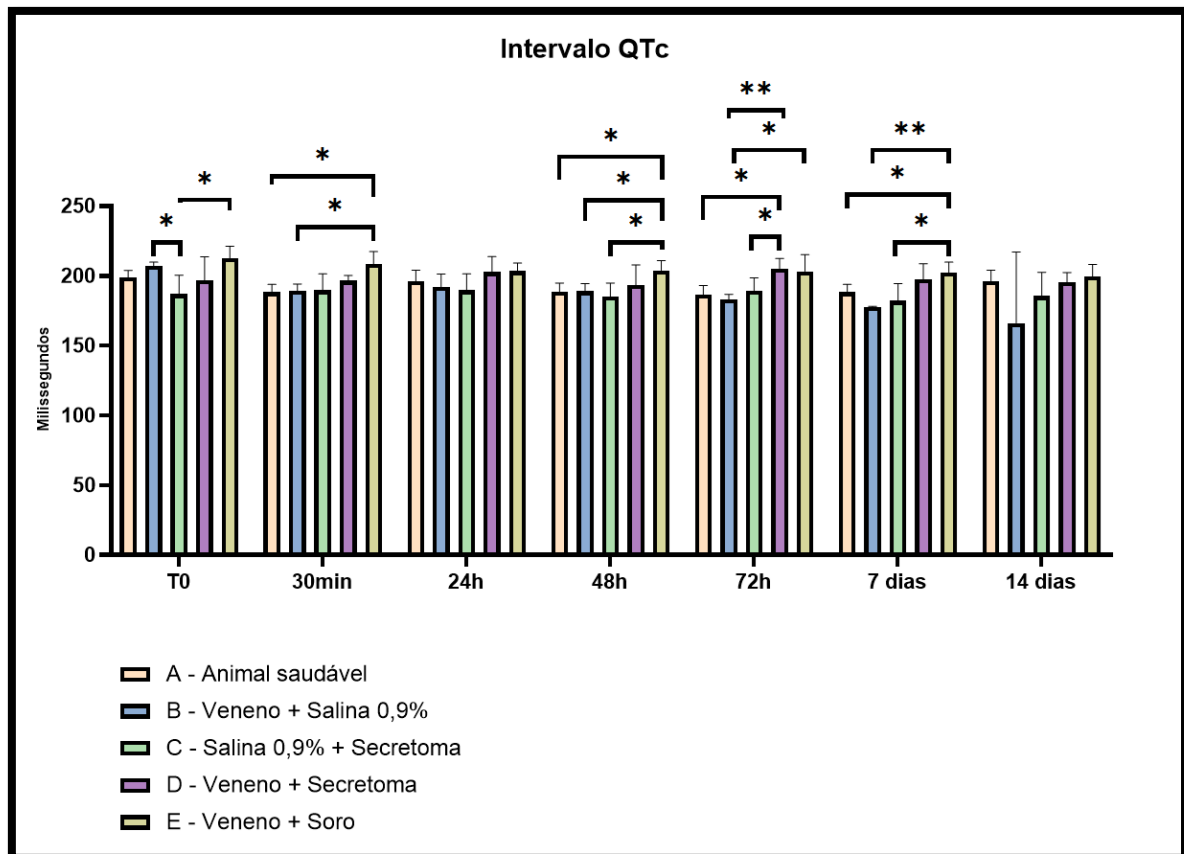


Figura 32. Valores médios da duração do intervalo QTc nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

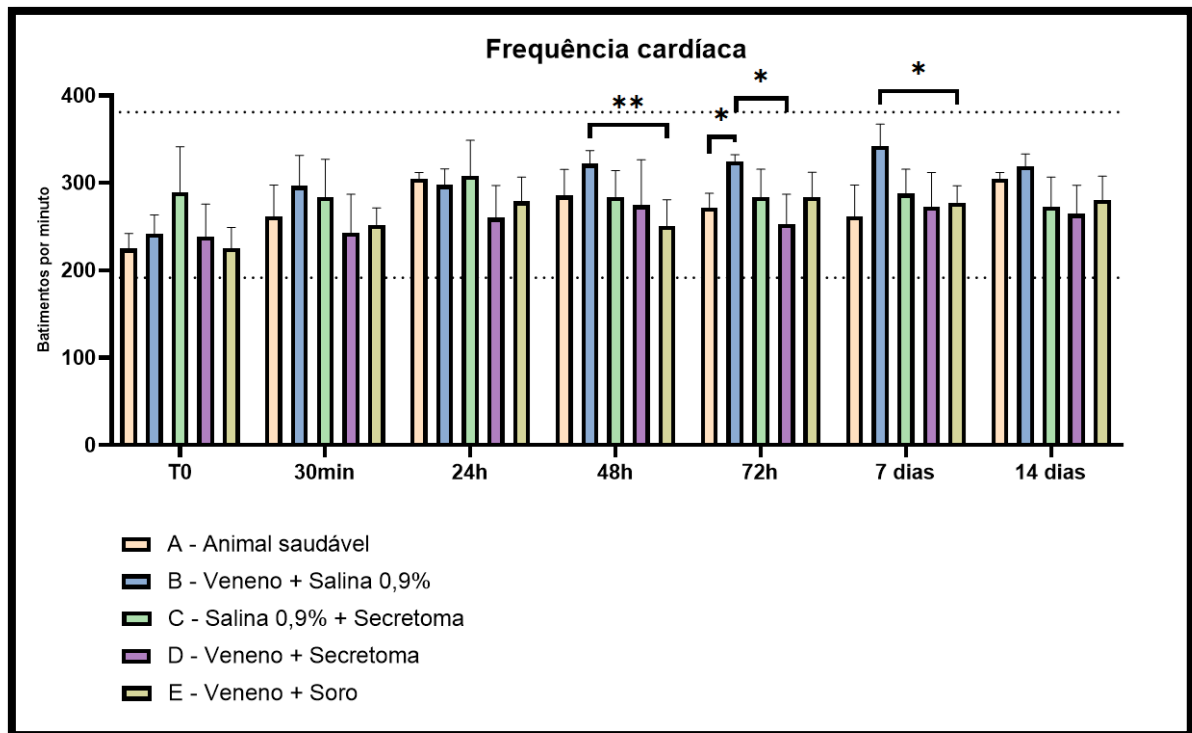


Figura 33. Valores médios da FC nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

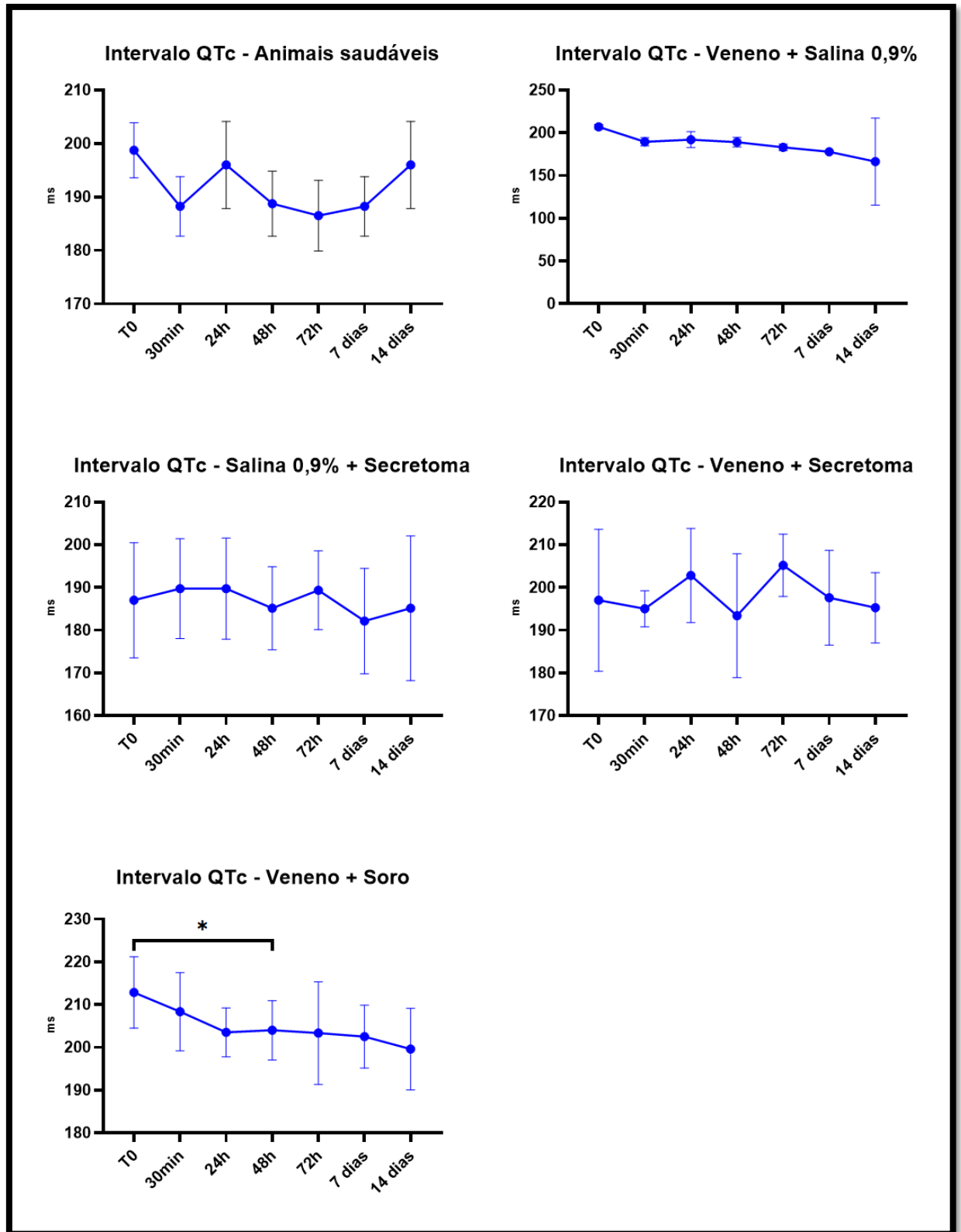


Figura 34. Valores médios da duração do intervalo QTc em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* p < 0,05

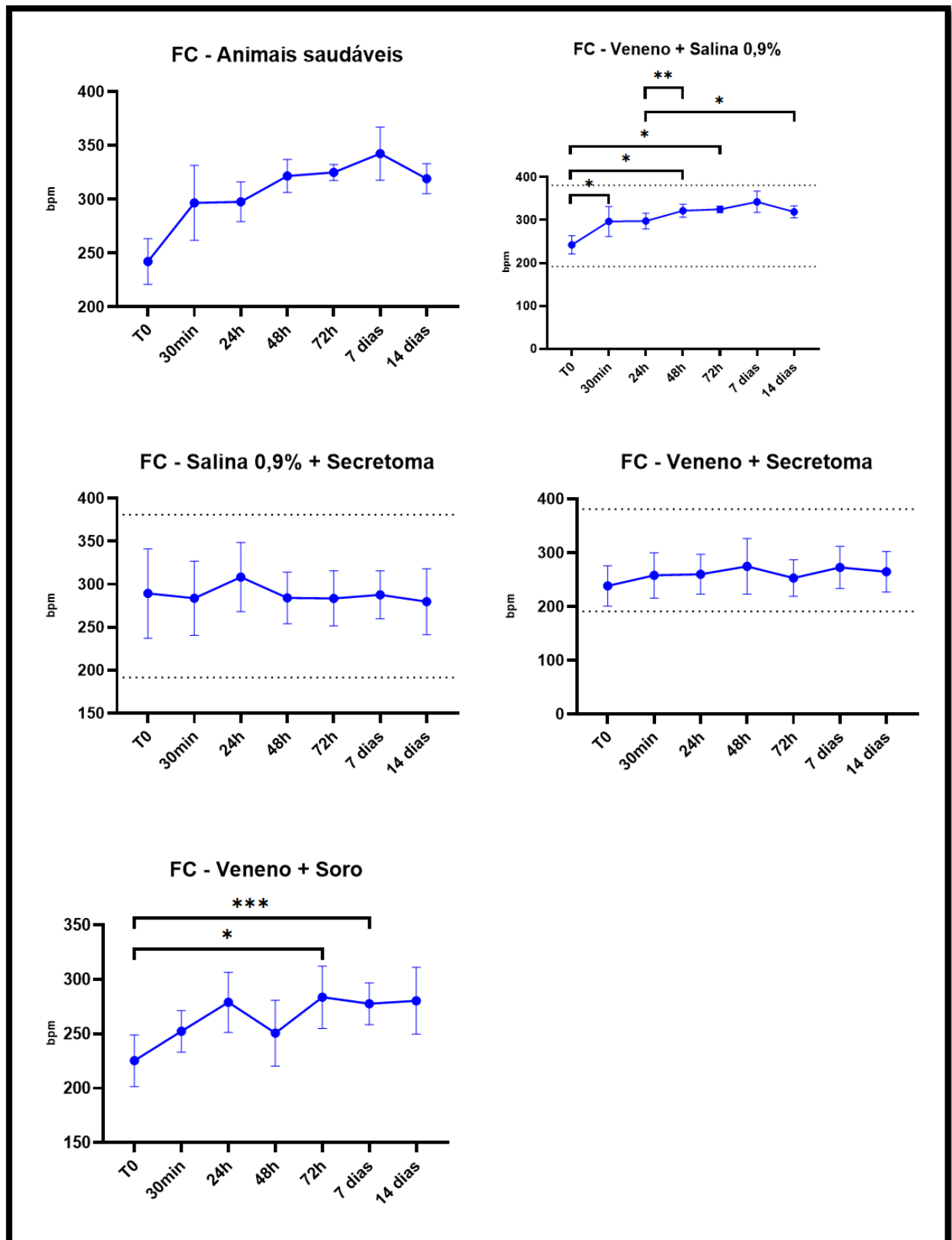


Figura 35. Valores médios da FC em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,003$ .

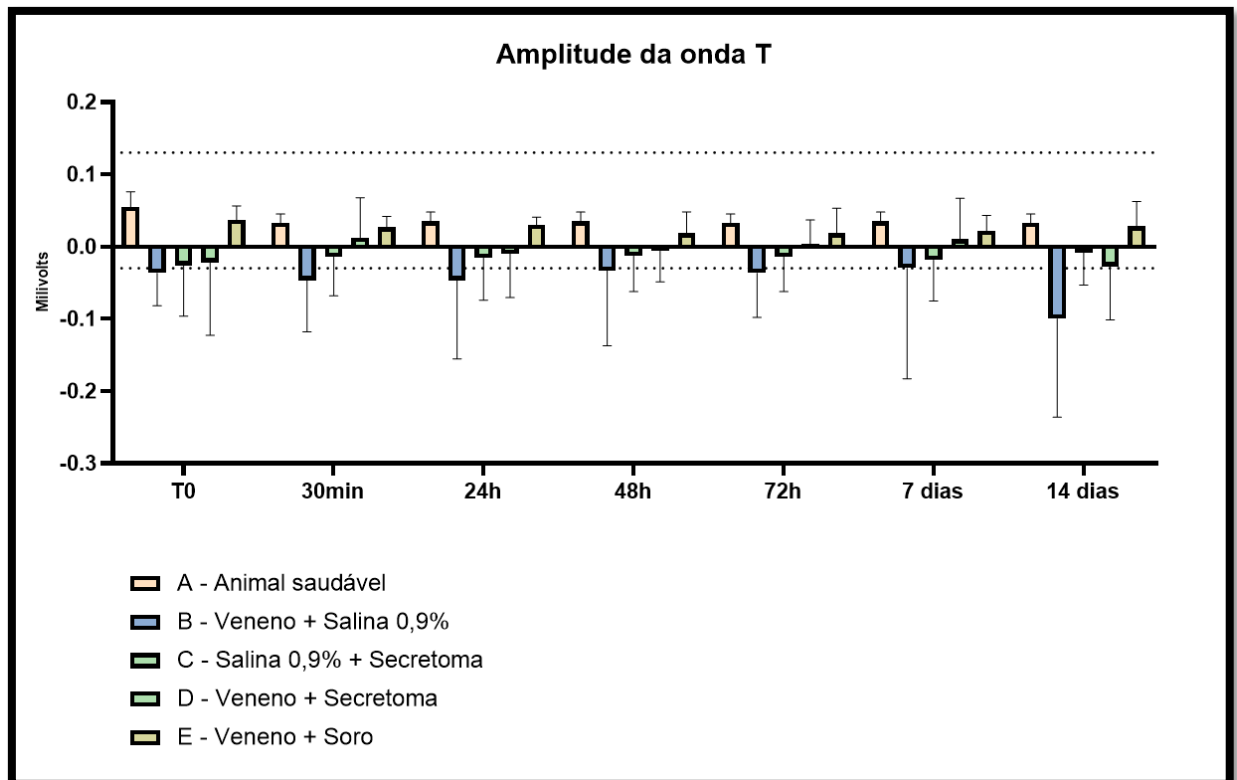


Figura 36. Valores médios da amplitude da onda T nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

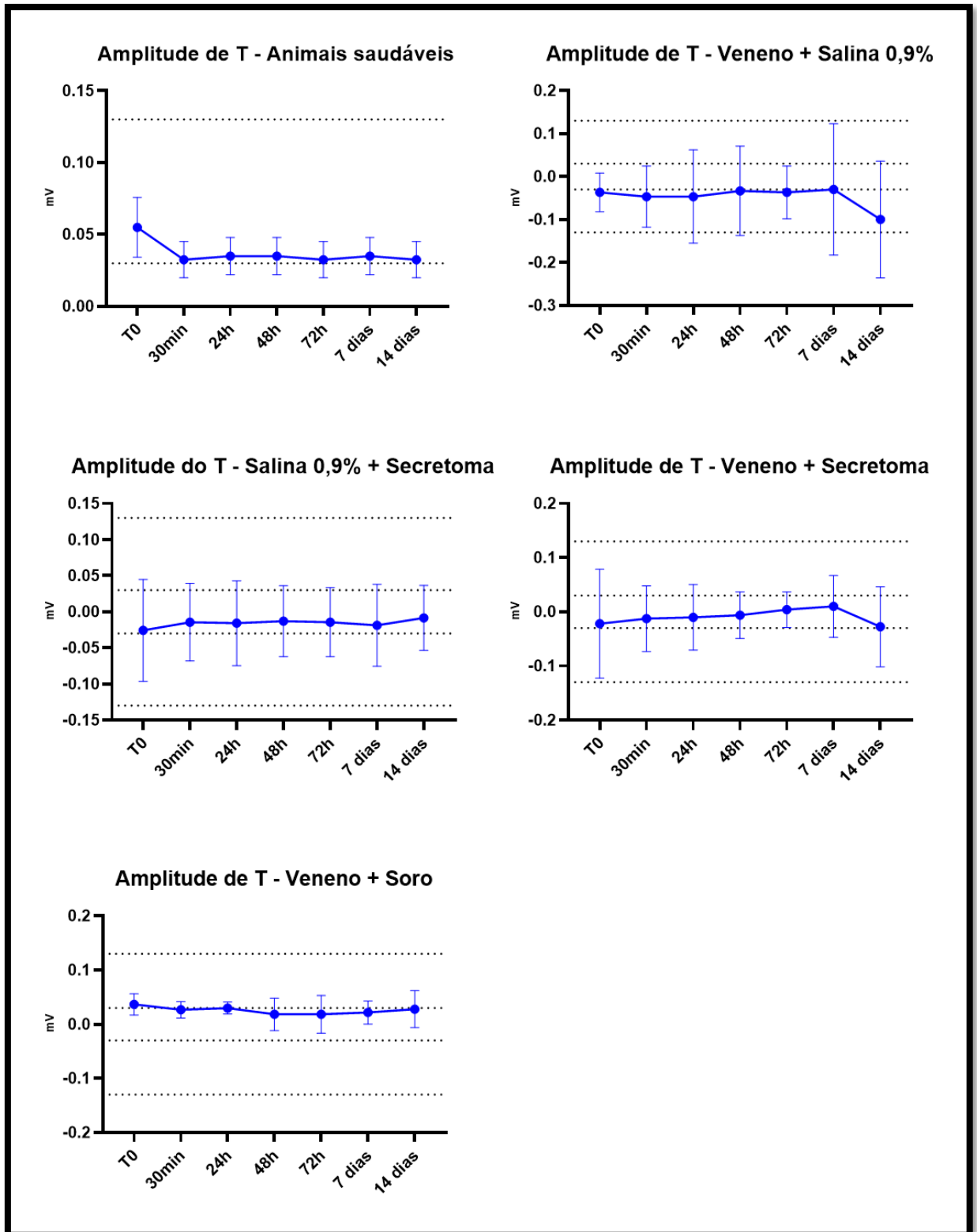


Figura 37. Valores médios da variação na amplitude da onda T em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

Além dos parâmetros relatados acima, observa-se no Quadro 6 as alterações de ritmo registradas nos diferentes grupos durante o experimento.

Quadro 6. Alterações eletrocardiográficas identificadas nos diferentes grupos ao longo do experimento

<b>GRUPO</b>	<b>30min</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>
Salina 0,9% + salina 0,9%  (controle negativo)	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Veneno + Salina 0,9%  (controle positivo)	EAs isoladas, dissociação AV, pré-excitação ventricular, batimentos juncionais, salva de TAt, EV isolada, condução aberrante	EAs isoladas, dissociação AV, pré-excitação ventricular, batimentos juncionais,	EAs isoladas, ritmo juncional, EV em par, salva de TAt, condução aberrante	EAs isoladas, batimentos juncionais, dissociação AV, pré-excitação ventricular, salva de TAt	EAs isoladas, batimentos juncionais, dissociação AV, pré-excitação ventricular, salva de TAt	EAs isoladas, batimentos juncionais, dissociação AV, pré-excitação ventricular, salva de TAt, BAV 2º grau
Salina 0,9% + Secretoma	TS, EAs isoladas, batimentos juncionais	TS, Batimentos juncionais, EAs isoladas, salva de TAt, salva de TV	Batimentos juncionais	Batimentos juncionais	Batimentos juncionais	EAs isoladas, batimentos juncionais
Veneno + secretoma	EAs isoladas, batimentos juncionais	EAs isoladas, batimentos juncionais	EAs isoladas	Batimentos juncionais	Batimentos juncionais	Sem alterações
Veneno + soro antiloxoscélico	EAs isoladas	Sem alterações	EAs isoladas	EAs isoladas	Sem alterações	Sem alterações

BAV: Bloqueio atrioventricular. EA: Extrassístole atrial. EV: Extrassístole ventricular. TAt: Taquicardia atrial. TS: Taquicardia sinusal. TV: Taquicardia ventricular.

Os animais saudáveis mantiveram ritmo sinusal ao longo de todo o estudo, conforme se observa na figura 38.



Figura 38. Traçado eletrocardiográfico de cobaia hígida mostrando ritmo sinusal. Derivação D2 a 50mm/s e sensibilidade N.

Considerando o exposto na tabela, percebe-se que os grupos com mais alterações de ritmo foram o B e o grupo C.

Em algumas cobaias, houve redução da quantidade e frequência dos eventos arrítmicos ao longo do experimento. Em outros, não. Nos animais desafiados com veneno e tratados com salina 0,9%, as alterações estiveram presentes até o último dia de avaliação. Abaixo, estão imagens dos eventos eletrocardiográficos registrados e descritos no quadro (da figura 39 até a figura 42):



Figura 39. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B (veneno + salina 0,9%) mostrando uma taquicardia sinusal. Derivação D2 a 50mm/s e sensibilidade N.

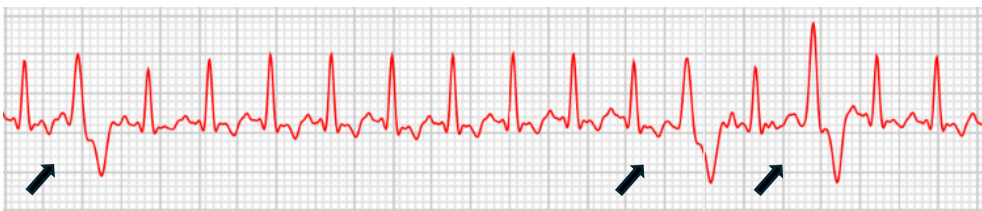


Figura 40. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B (veneno + salina 0,9%) evidenciando extrassístoles ventriculares (setas pretas). Derivação D2 a 50mm/s e sensibilidade N.

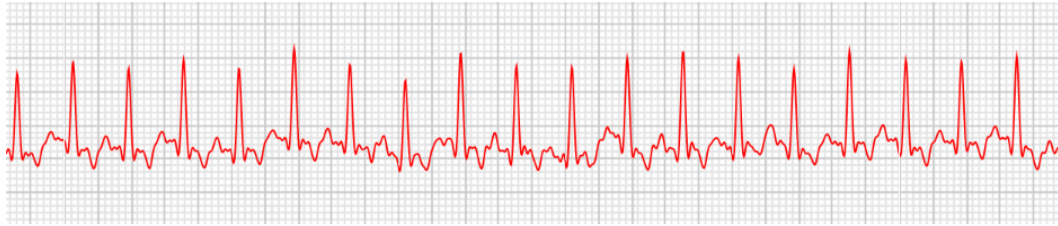


Figura 41. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B (veneno + salina 0,9%) mostrando uma taquicardia atrial. Derivação D2 a 50mm/s e sensibilidade N.

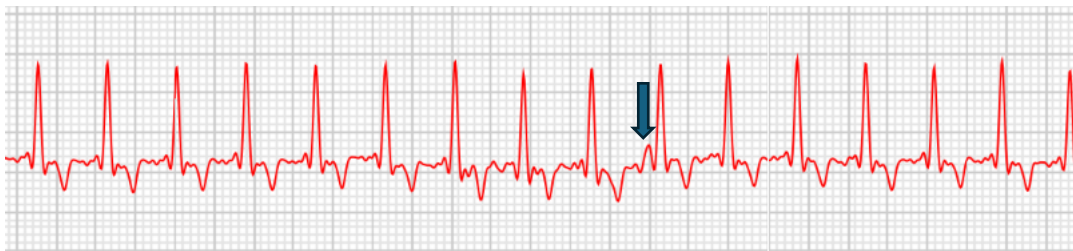


Figura 42. Traçado eletrocardiográfico de cobaia do grupo B (veneno + salina 0,9%), no qual se observa ritmo juncional, caracterizado por ondas P negativas. Observa-se também uma onda P com morfologia diferente das demais e muito próxima ao complexo QRS, podendo se tratar de dissociação AV (seta azul). Derivação D2 a 50mm/s e sensibilidade N

O grupo C apresentou arritmias e distúrbios de condução, porém em quantidade e frequência inferiores ao grupo B. Nas figuras abaixo estão as modificações identificadas no ECG do grupo secretoma (figuras 43 e 44).

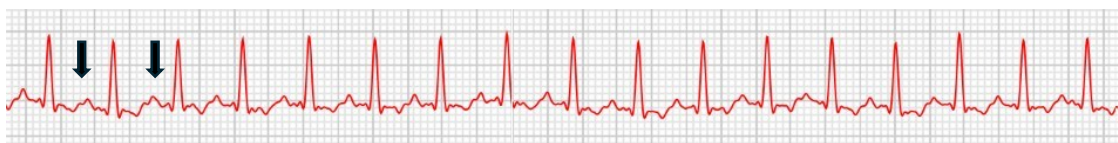


Figura 43. Traçado de cobaia do grupo C (salina 0,9% + secretoma), evidenciando extrassístoles atriais (setas pretas). Derivação D2 a 50mm/s e sensibilidade N.



Figura 44. Traçado de cobaia do grupo C (salina 0,9% + secretoma) evidenciando batimentos juncionais. A seta preta aponta a ausência de onda P. A seta azul aponta uma onda P negativa. Ambas as ondas caracterizam batimentos juncionais. Derivação D2 a 50mm/s.

O grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma (grupo D) também apresentou modificações eletrocardiográficas (Figura 45). Entretanto, estas foram em menor proporção quando comparadas aos animais envenenados e tratados com solução salina 0,9% (grupo B). Isso é um indicativo de efeito positivo do secretoma nos indivíduos envenenados, uma vez que foram identificadas menos arritmias do que nas cobaias que não receberam tratamento. Na figura abaixo, é possível observar um ritmo juncional, registrado em cobaia do grupo D.

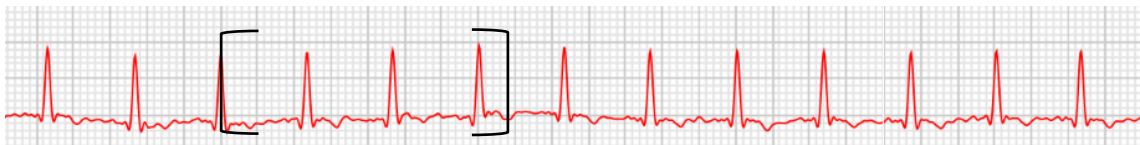


Figura 45. Traçado de cobaia do grupo D (veneno + secretoma) evidenciando batimentos juncionais (entre colchetes). Os três batimentos seguidos caracterizam um ritmo juncional. Derivação D2 a 50mm/s e sensibilidade N.

O grupo desafiado com o veneno e tratado com o soro antiloxoscélico (grupo E) foi o que teve ECG mais semelhante ao dos animais saudáveis. Foram registradas poucas alterações, com baixa frequência e intensidade. Tal resultado demonstra que o soro neutralizou os efeitos do veneno loxoscélico no coração das cobaias.

De acordo com Swanson e Vetter (2006), os efeitos do envenenamento ocorrem cerca de duas a oito horas após a picada. O desenvolvimento de sinais sistêmicos, se ocorrer, também se dá após poucas horas. Dessa forma, compreende-se que os principais sinais do envenenamento são agudos e de grande relevância nas primeiras horas e dias após o acometimento, indicando maior importância e intensidade nos momentos iniciais. Dias-Lopes et al. (2010) avaliaram a distribuição do veneno de *L. intermedia*, após sua aplicação subcutânea em camundongos, em diferentes tecidos. Foi realizada identificação de antígenos no tecido cardíaco 10 minutos após a administração. A concentração de veneno atingiu seu pico neste órgão em 15 minutos. Considerando o exposto, há uma cinética rápida de distribuição. Embora se trate de uma espécie e dose diferentes, nossos achados parecem corroborar o descrito, uma vez que 30 minutos após o envenenamento foram identificadas alterações eletrocardiográficas.

### 5.3. Hematologia e bioquímica plasmática

As análises hematológicas realizadas foram: número total de eritrócitos (ERI), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos totais (LEU totais), heterófilos (HET), linfócitos (LINF), monócitos (MON), eosinófilos (EOS) e plaquetas (PLT). Os resultados da série vermelha serão apresentados e discutidos em conjunto, uma vez que são parâmetros que se correlacionam.

Os exames bioquímicos foram efetuados com o plasma obtido após a centrifugação das amostras em EDTA. Foram avaliados CK-MB, cTnI e o NTPró-BNP.

Para discussão dos resultados, além das comparações entre antes e depois dos grupos e dos indivíduos, também serão considerados os valores de referência da espécie, descritos no quadro 7:

Quadro 7. Valores de referência de parâmetros hematológicos e bioquímicos de cobaias

<b>PARÂMETRO</b>	<b>VALOR DE REFERÊNCIA</b>
ERI (x 10 <sup>6</sup> /μL)	4,36 – 6,84
Hb (g/dL)	11,6 – 17,2
Ht (%)	37 – 47
VCM (fL)	71 – 83
CHCM (%)	29,7 – 38,9
PLT (x 10 <sup>3</sup> /μL)	260 – 740
LEU totais (x 10 <sup>3</sup> /μL)	5,5 – 17,5
HET (%)	28 – 56
LINF (%)	40 – 62,5
MON (%)	3,3 – 5,3
EOS (%)	1 – 7
RDW-SD	Não descrito na literatura
CK-MB (U/L)	29 – 422,68
Troponina I (ng/mL)	0,2 – 12,5

Fontes: Zimmerman et al., 2015; Botelho et al., 2016; Life diagnostics, 2022.

### 5.3.1. Exames hematológicos

As figuras 46 e 47 mostram a contagem de ERI entre os diferentes grupos experimentais e num mesmo grupo, respectivamente.

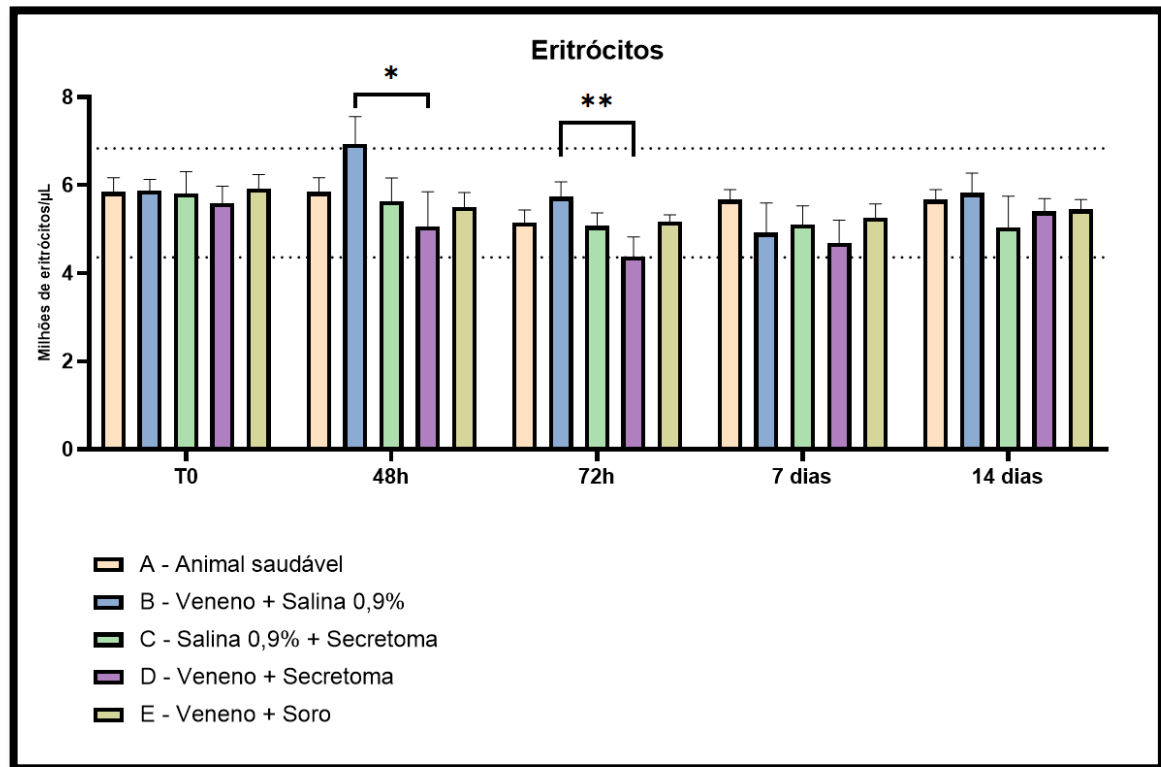


Figura 46. Valores médios do número total de ERI nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

Foram registradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos tempos 48h e 72h. O grupo B teve valor superior ao grupo D na contagem total de ERI no tempo 48h. Tal diferença continuou a ser observada entre os grupos, no tempo 72h, com maior grau de significância ( $p < 0,005$ ). O grupo B teve contagem de ERI no limite superior da referência da espécie no tempo 48h, indicando uma elevação real do parâmetro neste grupo.

Quando avaliado o comportamento do número de ERI em cada grupo, foram observadas diferenças estatísticas entre os indivíduos dos grupos C, D e E. No grupo C, houve redução na contagem de ERI nos tempos 72h e 7 dias quando comparados ao T0. No desafiado com veneno e tratado com secretoma, houve redução significativa na contagem de ERI entre os T0 e 72h. Já no grupo E, o número total de ERI foi menor nos tempos 72h e 7 dias em relação ao T0.

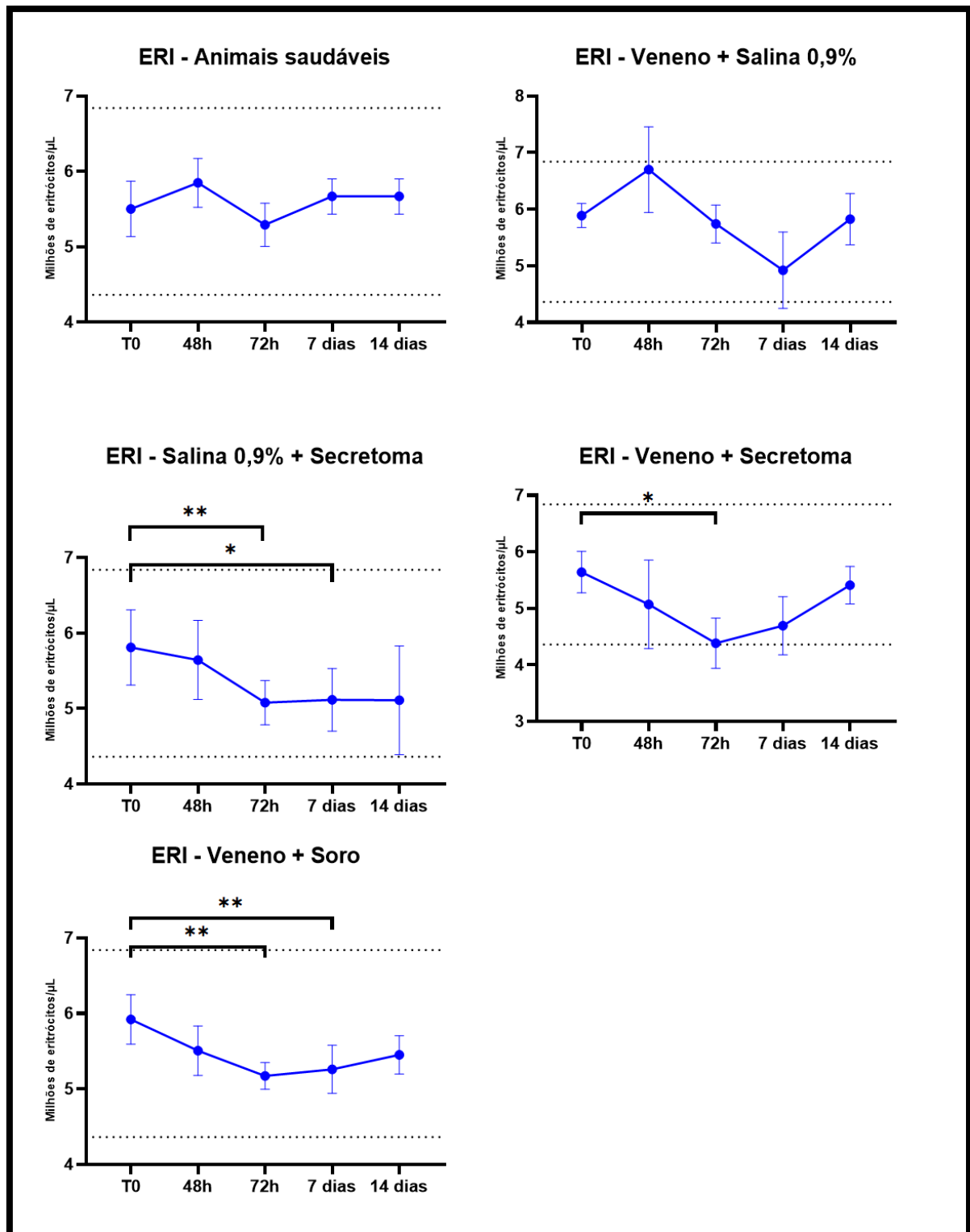


Figura 47. Valores médios do número total de ERI em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

O envenenamento loxoscélico pode ocasionar anemia hemolítica, interferência nas PLT e coagulação intravascular disseminada (CID). Os principais achados laboratoriais relacionados

a esse quadro são redução na concentração de ERI e indicadores de lise celular, assim como trombocitopenia (Futrell, 1992).

Ao analisar a figura 47, é possível observar que, embora sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ), houve um aumento da contagem de ERI no grupo B às 48h em relação ao seu T0. A contagem retorna a valores semelhantes aos do T0 às 72h após o envenenamento. Já o grupo D apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na sua contagem de ERI no tempo 72h em relação ao T0, que ficou abaixo da referência da espécie no tempo 72h, indicando uma possível implicação clínica. Os achados específicos do grupo B, no que diz respeito aos ERI, não indicam a ocorrência de quadro hemolítico e diferem do esperado, uma vez que o número total de ERI aumentou. Tal observação pode se tratar de uma eritrocitose relativa, ou seja, elevação na contagem de células vermelhas por diminuição do volume plasmático, provavelmente por desidratação (Mithoowani et al., 2020). Fernandes (2024), ao testar diferentes doses de veneno loxoscélico em cobaias e avaliar seus efeitos hematológicos, encontrou eritrocitose em alguns dos animais envenenados e também associou seu resultado a um quadro de desidratação. Já o registrado no grupo D pode ter sofrido interferências de ação do veneno, do secretoma ou do sinergismo entre ambos, o que acentuou a diferença em relação ao grupo B.

Como não foi identificada alteração significativa entre os animais saudáveis e os desafiados com veneno e tratados com solução salina 0,9%, infere-se que a dose de veneno aplicada não foi suficiente para causar hemólise. Dessa forma, as variações observadas provavelmente são fruto de um quadro de desidratação e de efeitos do secretoma (ou seu sinergismo com o veneno) em diminuir o número total de ERI. O grupo tratado apenas com secretoma apresentou redução de ERI nos tempos 72h e 7 dias em relação ao T0. Esse resultado indica efeito direto do secretoma nas células sanguíneas. O grupo desafiado com veneno e tratado com soro também apresentou redução no número de ERI nos tempos 72h e 7 dias em relação ao T0, sendo essa mais acentuada às 72h. As variações observadas no grupo D, provavelmente, se devem à ação exclusiva do secretoma, uma vez que o veneno isoladamente não mostrou tal efeito nos indivíduos do grupo B.

Por fim, a menor concentração de ERI nos indivíduos do grupo E (veneno + soro antiloxoscélico) pode se dever ao fato de que o soro é composto por proteínas heterólogas, que podem, em maior ou menor escala, acarretar efeitos colaterais aos indivíduos que o recebem.

Embora tenham sido identificadas diferenças relevantes entre os grupos e entre indivíduos de um mesmo grupo, a contagem de ERI se manteve nos valores de referência da espécie. Somente o grupo B (veneno + solução salina 0,9%), que no tempo 48h, apresentou um

valor médio acima da referência e, o grupo D (veneno + secretoma), que apresentou valor médio abaixo da referência no tempo 72h.

A figura 48 mostra as diferenças entre os grupos ao longo do experimento com relação à concentração de Hb.

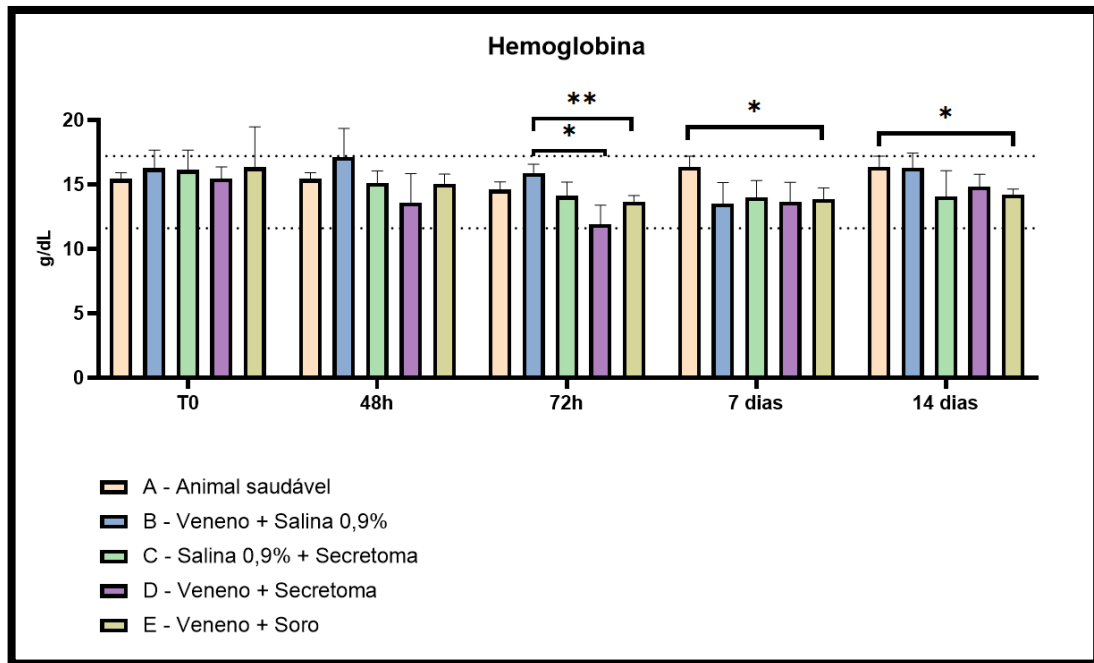


Figura 48. Valores médios da concentração de Hb nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

Apesar das diferenças registradas em relação à concentração de Hb, os valores se mantiveram dentro da normalidade para a espécie, com exceção do grupo D, que teve valor médio no limite inferior do intervalo de referência, indicando efeito mais pronunciado nesses animais. Embora o veneno isoladamente não tenha reduzido a concentração de Hb, o mesmo também não ocorreu no grupo C. Dessa forma, é provável que tenha havido um sinergismo entre veneno e secretoma, afetando a Hb. Sendo assim, não é possível excluir que a redução de ERI também pode ter sido resultado do sinergismo entre o veneno e o secretoma.

Na figura 49, é possível ver como foi o comportamento da Hb em cada grupo experimental. Houve redução significativa na concentração de Hb nos indivíduos dos grupos C e D. As variações reforçam o possível efeito do secretoma nas células vermelhas, afetando a concentração de Hb por consequência.

As oscilações na concentração de Hb seguem padrão semelhante ao observado na contagem de ERI. Por se tratar de uma proteína presente nos ERI, seus níveis variam juntamente com mudanças no número dessas células. Sua redução está associada a quadros anêmicos. Já o seu aumento pode ocorrer em função de policitemia vera, desidratação, hipoxemia crônica, entre outros (Subba & Kumar, 2024). No tempo 72h, a maior concentração de Hb no grupo B em relação aos grupos D e E se associa com o aumento e redução da massa eritrocitária nesses grupos, respectivamente.

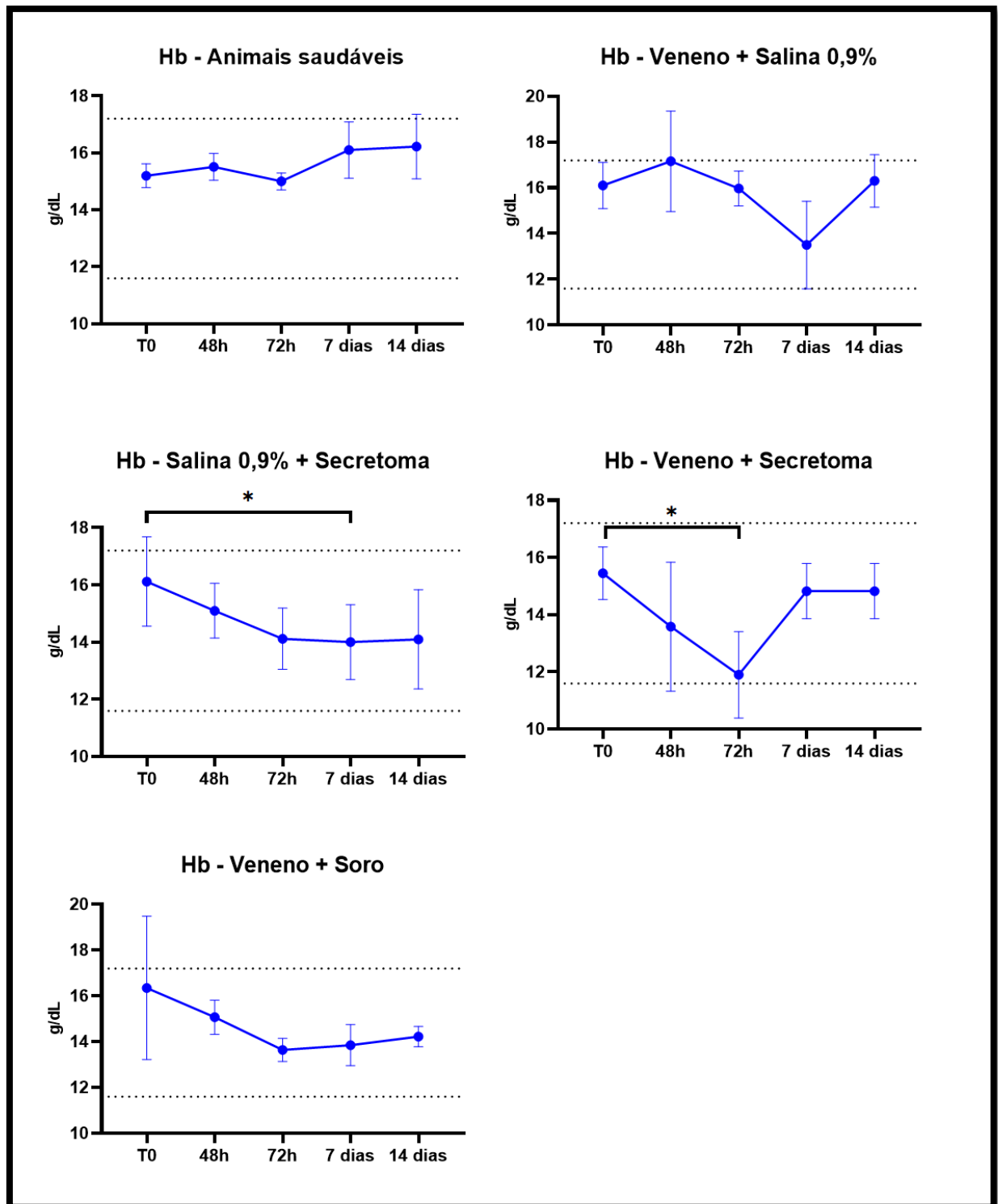


Figura 49. Valores médios da concentração de Hb em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ .

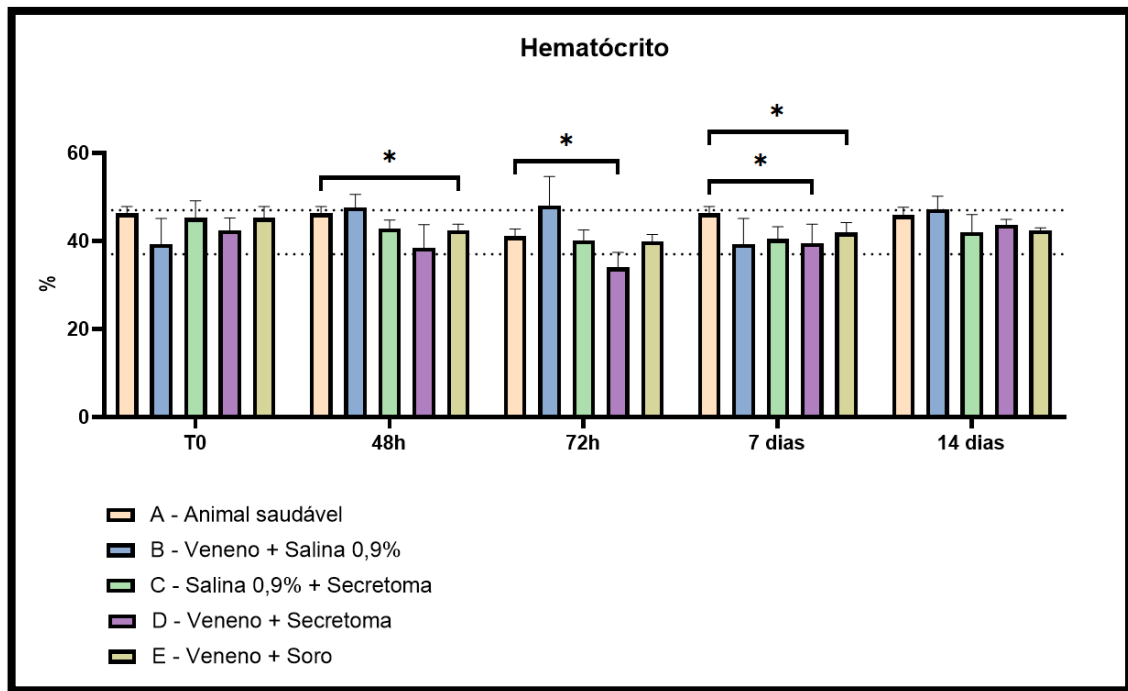


Figura 50. Valores médios do Ht nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ .

No que se refere ao Ht, é possível ver na figura 50 a variação desse parâmetro entre os grupos durante o período de experimentação. Apenas o grupo D apresentou um valor médio de Ht inferior ao estabelecido para a espécie, no tempo 72h, semelhante ao que ocorreu com os ERI e a Hb, indicando que esses animais apresentaram um discreto quadro anêmico.

O Ht é uma forma de mensurar o volume de ERI no volume total de sangue, sendo expresso em porcentagem. É uma medida que auxilia na identificação de anemia ou policitemia. Seus níveis variam de acordo com a quantidade de ERI presentes na corrente sanguínea, bem como são afetados por hemoconcentração ou hemodiluição (Mondal & Budh, 2020).

O Ht inferior ao de animais saudáveis no grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma (grupo D), no tempo 72h, correlaciona-se com a diminuição do número total de ERI, sugerindo uma causa em comum para o observado. Ações do veneno e secretoma, de forma sinérgica ou não, levaram a valores menores de ERI, afetando os demais parâmetros dependentes deste. Na figura 51, observa-se a oscilação do Ht em cada grupo experimental. Houve redução nos grupos C e D. As variações identificadas entre os indivíduos dos grupos C e D corroboram essa hipótese. Entretanto, somente o grupo D apresentou Ht abaixo da normalidade para a espécie.

O VCM é uma medida do tamanho dos eritrócitos. É utilizado na classificação de anemias, que podem ser normocíticas (eritrócitos com tamanho normal), macrocíticas

(eritrócitos com tamanho acima do normal) ou microcíticas (eritrócitos com tamanho abaixo do normal), indicando presença ou ausência de resposta medular e auxiliando na elucidação da causa primária (Yavorkovsky, 2021). As anemias regenerativas são aquelas nas quais o organismo consegue responder proporcionalmente à redução da massa eritrocitária, aumentando a produção medular de células vermelhas. Isso culmina na liberação de eritrócitos jovens na corrente sanguínea, como os reticulócitos e células policromatófilicas, que são maiores que as células vermelhas maduras. Só ocorrem em casos de hemólise intravascular ou extravascular e em hemorragias (Tyler & Cowell, 1996).

É possível observar o comportamento do VCM entre os diferentes grupos experimentais na figura 52. Foram observadas diferenças no tempo 7 dias, mas os valores encontrados estavam no intervalo de referência da espécie. O grupo D teve um valor médio de VCM no limite superior da normalidade.

Na figura 53, observa-se a variação do VCM em cada grupo experimental. Apenas os animais desafiados com solução salina 0,9% e tratados com secretoma (grupo C) tiveram diferenças significativas, com o valor mais elevado de VCM no tempo 7 dias, indicando regeneração nos indivíduos que tiveram anemia.

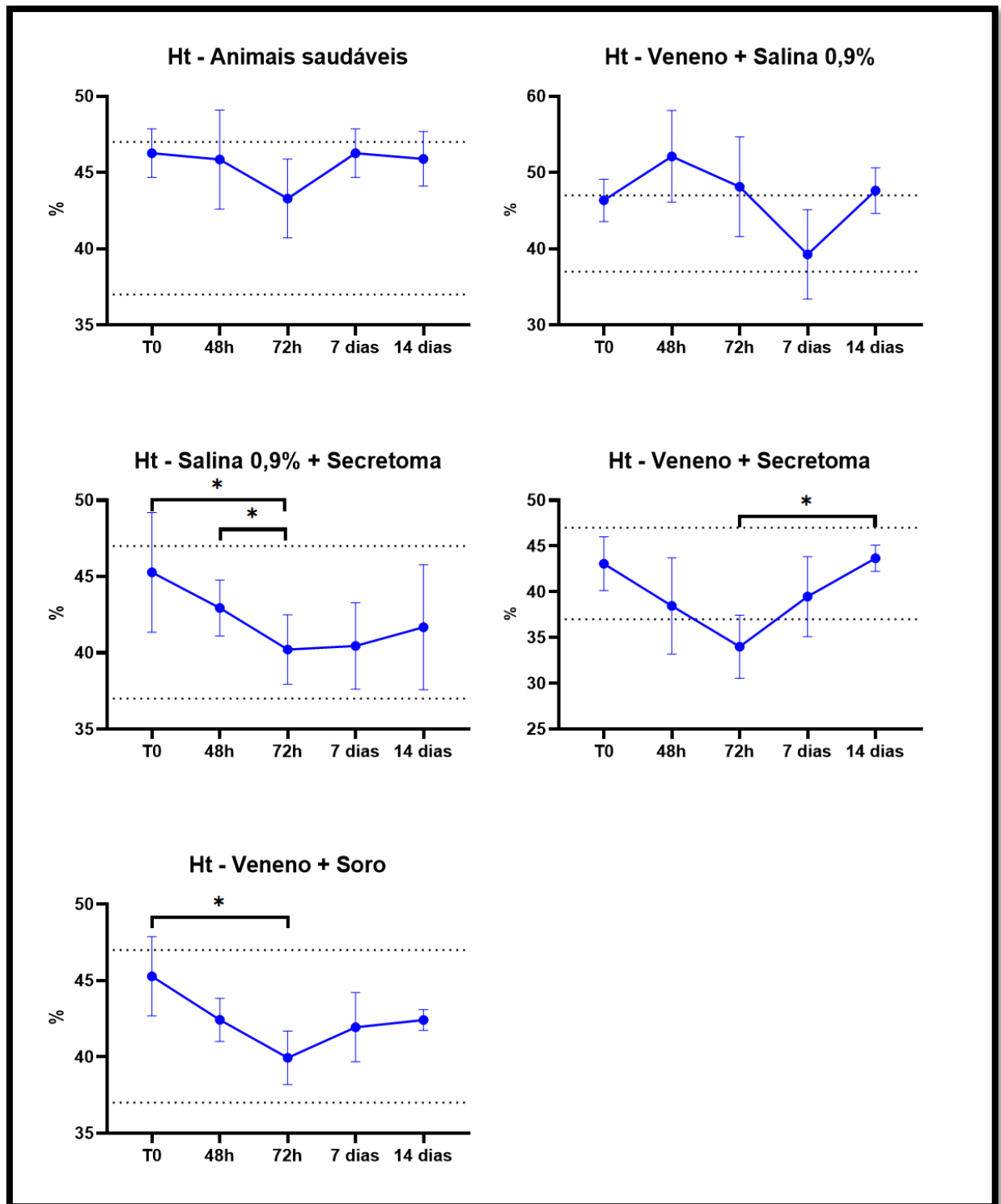


Figura 51. Valores médios do Ht em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ .

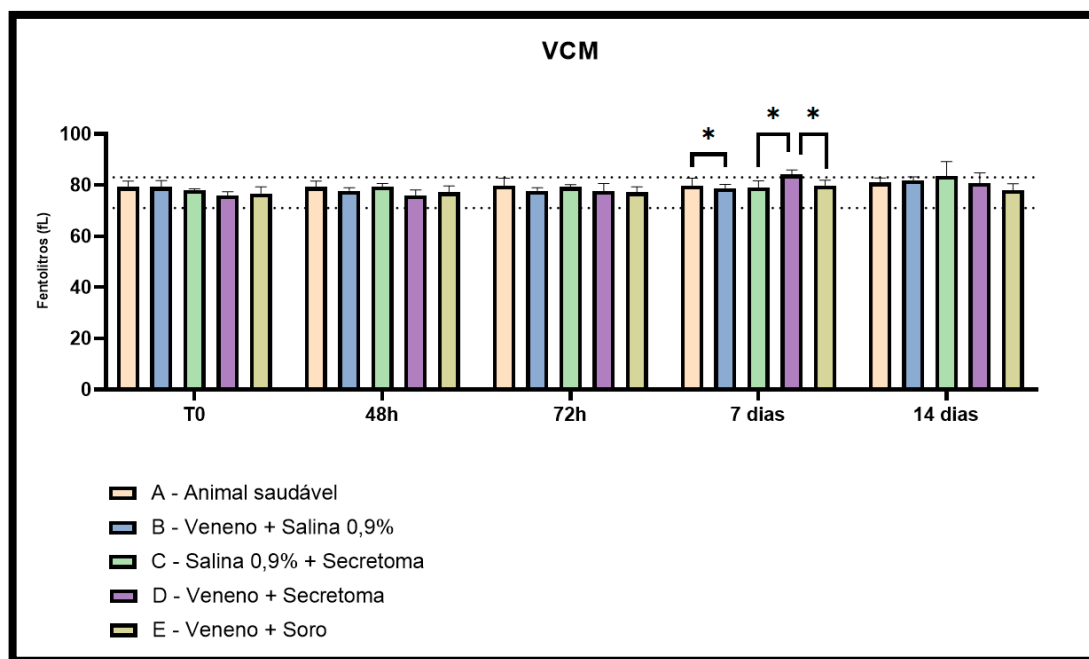


Figura 52. Valores médios do VCM nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ .

Na figura 54, está representado o CHCM entre os diferentes grupos durante o período de avaliação. Já na figura 55, observa-se a variação desse índice em cada grupo experimental.

O CHCM representa a quantidade de Hb presente nos ERI por unidade de volume. Em conjunto com o VCM, é utilizado na classificação de anemias. Além da avaliação do tamanho, conforme explicado, as anemias podem ser normocrômicas ou hipocrômicas, ou seja, com conteúdo normal ou reduzido de Hb nos eritrócitos. A hipocrômica é observada quando os ERI possuem um volume maior e ainda não completaram sua saturação com a Hb, o que reduz o CHCM (Stockham & Scott, 2008).

Apesar das diferenças estatísticas identificadas, os valores de CHCM se mantiveram dentro do esperado para a espécie, indicando baixa relevância desses achados.

Analisando o comportamento do CHCM no grupo E, percebe-se que houve redução progressiva desse índice ao longo dos 14 dias do estudo, assim como ocorreu com os ERI, Hb e Ht. Esses valores se mantiveram no intervalo de referência da espécie. Todavia, tais oscilações podem ser relevantes para um indivíduo, quando se pensa que o impacto clínico é variável de um animal para outro. As variações no grupo B foram menores e se mantiveram no estabelecido para a espécie, o que sugere que, nesses animais, a oscilação do CHCM não foi tão relevante.

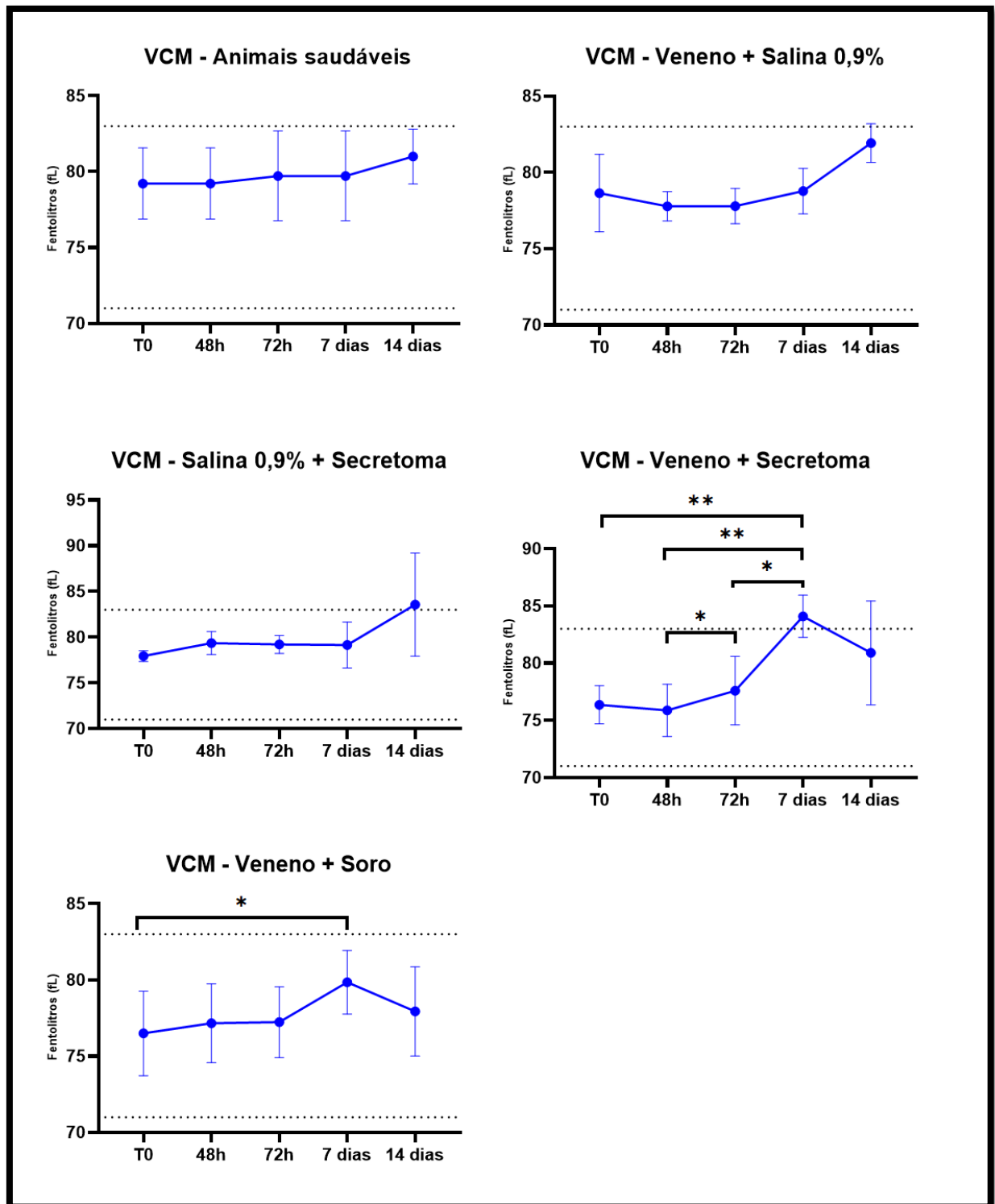


Figura 53. Valores médios do VCM em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

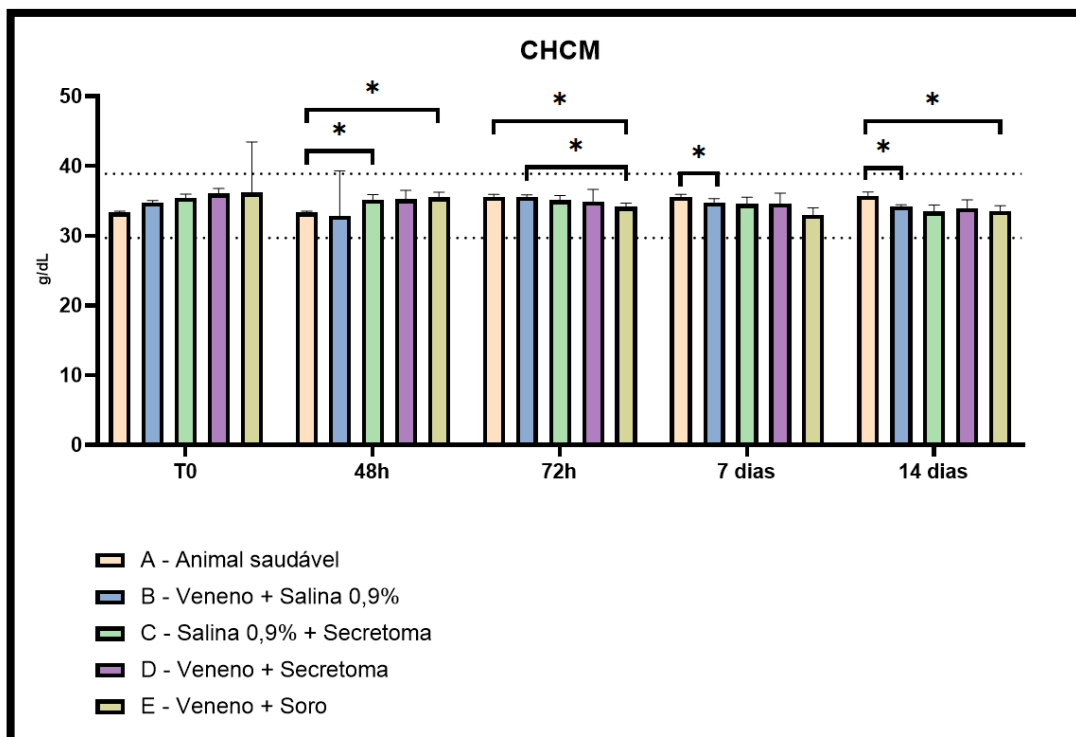


Figura 54. Valores médios do CHCM nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.  
\* $p < 0,05$

Efeitos do envenenamento loxoscélico nos ERI podem gerar anemia hemolítica e trombocitopenia (Gremski et al., 2022). Tais ocorrências contribuem para risco aumentado de CID, microtrombos e dano vascular, gerando desdobramentos na vascularização dos órgãos (Cappellini, 2007). A isquemia miocárdica causa danos celulares estruturais e instabilidade elétrica (Kingma et al., 2023), o que pode ter afetado o ECG das cobaias. Há pouca informação na literatura sobre a ação direta do secretoma nos ERI. Trabalhos demonstram que seu uso pode aumentar a densidade sanguínea em cenários de isquemia miocárdica (He et al., 2023; Guan et al., 2025a). Existem relatos sobre a ação deletéria do secretoma nos ERI (Soni et al., 2016). Sipos e Múzes (2021) relatam que a pró-coagulação pode ser um dos seus efeitos colaterais. De acordo com Rahimi et al. (2021), há produção de espécies reativas de oxigênio durante o processo de isolamento, cultura celular e transplante das células-tronco mesenquimais, levando à liberação de radicais livres, culminando em morte celular, apoptose e limitação da capacidade terapêutica. Sendo assim, é possível inferir que os fatores solúveis na corrente sanguínea podem gerar impacto negativo aos ERI por dano oxidativo, corroborando com os achados obtidos nos animais do grupo C. Tal ação foi observada de forma mais intensa no grupo D, indicando que

seu uso pode ter intensificado efeitos do veneno, uma vez que esse grupo apresentou um quadro anêmico.

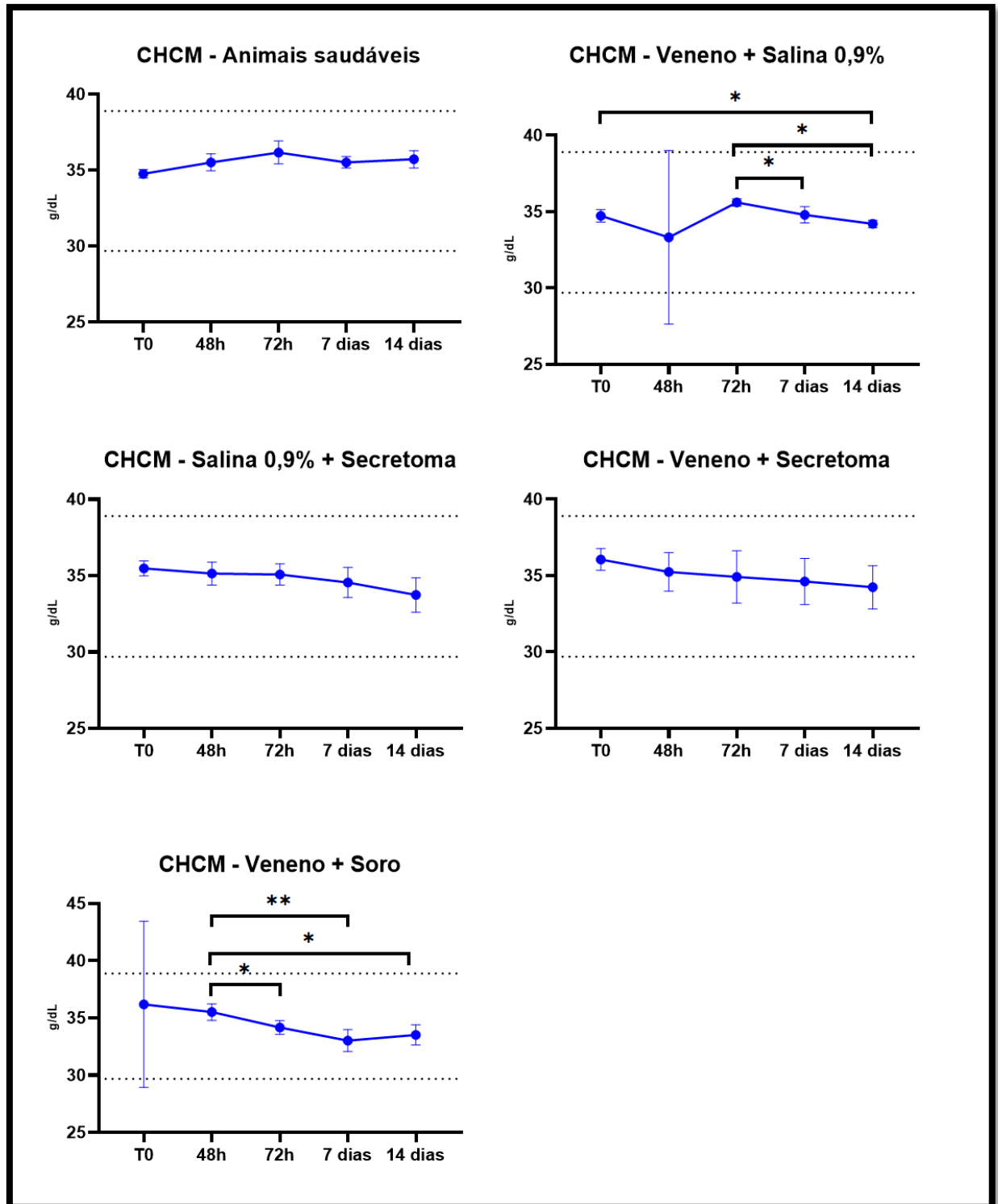


Figura 55. Valores médios do CHCM em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

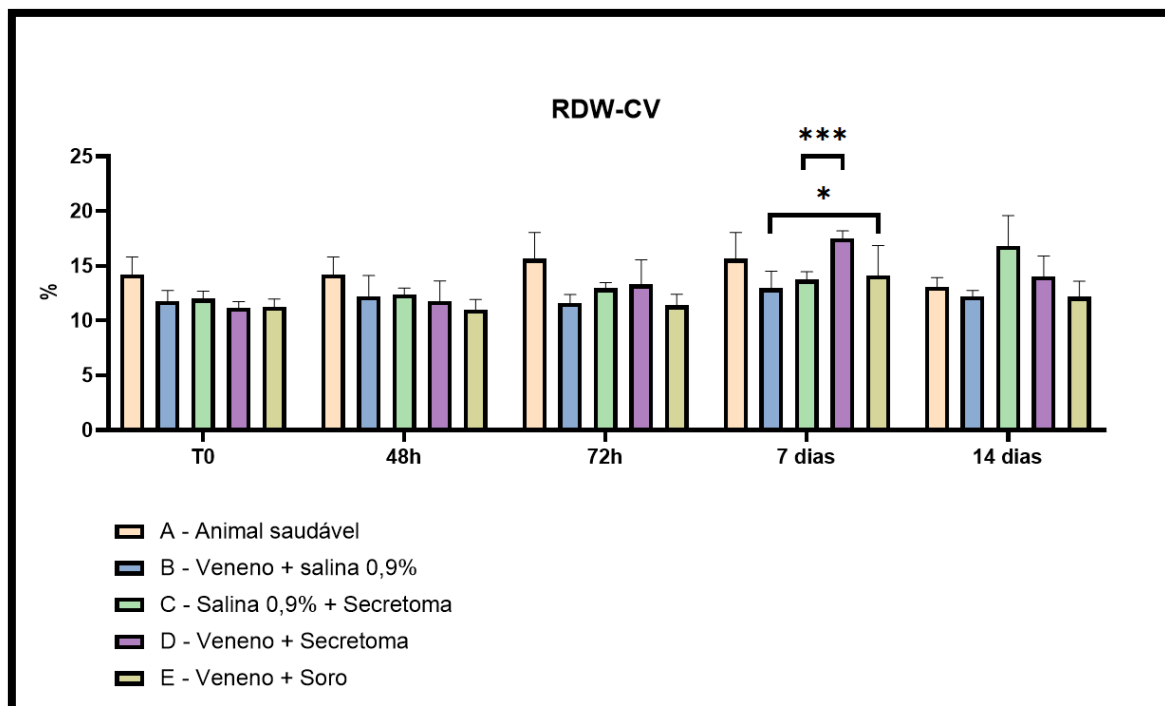


Figura 56. Valores médios do RDW-CV nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,003$ .

Na figura 56, estão registradas as variações do RDW-CV. O RDW é uma medida da amplitude de distribuição eritrocitária (do inglês, *red blood cell distribution width*). Variações no tamanho dos eritrócitos também são conhecidas como anisocitose. A sigla RDW-CV diz respeito ao coeficiente de variação dessa amplitude, ou seja, como oscila o volume dos ERI em relação ao VCM (Caporal & Comar, 2013). É um parâmetro apresentado no hemograma pela maior parte dos laboratórios e é muito utilizado no diagnóstico de patologias hematológicas em humanos, com padrões estabelecidos para doenças específicas (Chen et al., 2023). Seu uso ainda não é difundido na medicina veterinária. Portanto, não foram encontrados valores de referência deste parâmetro para a espécie *Cavia porcellus*. No tempo 7 dias, foram identificadas diferenças significativas entre os grupos. O RDW-CV foi menor no grupo B quando comparado ao grupo D. Com maior grau de significância, o valor de RDW-CV foi superior no grupo D em relação ao grupo C.

Abaixo, na figura 57, estão as variações do RDW-CV entre indivíduos de um mesmo grupo.

Os resultados obtidos corroboram os achados da massa eritrocitária, Hb, Ht e VCM já mencionados. O maior valor de RDW-CV no grupo D, no tempo 7 dias, indica a anisocitose e regeneração nesses animais. O grupo E, embora com menor variação, teve redução dos índices da série vermelha, justificando o valor de RDW-CV maior no tempo 7 dias.

O grupo C (solução salina 0,9% + secretoma) apresentou o pico de RDW-CV aos 14 dias, diferindo dos demais. Efeitos do veneno podem ter contribuído para o resultado semelhante entre os grupos D e E, que pode ter acelerado a resposta medular. O secretoma isoladamente parece ter apresentado resposta mais lenta.

De acordo com Vetter (2013), se há ocorrência de sinais sistêmicos de loxoscelismo, é importante haver um reconhecimento rápido do quadro, pois o mesmo pode ser fatal em 12 a 30h após o envenenamento. O autor também relata que, se não ocorrer hemólise em até 96h, é pouco provável que aconteça depois disso e que a anemia hemolítica costuma durar de 4 a 7 dias. Os achados hematológicos corroboram as observações do autor, uma vez que os animais tiveram pico de resposta no tempo 7 dias.

Na figura 58 observa-se a variação na contagem de plaquetas (PLT) nos diferentes grupos experimentais. Houve variação significativa na contagem de PLT nos tempos 48h, 72h e 7 dias. Apenas o grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9% (grupo B) apresentou contagem de PLT inferior ao normal para a espécie e teve recuperação no tempo 7 dias.

Na figura 59, os gráficos demonstram a contagem de PLT em cada grupo experimental. A diminuição no número de PLT, conhecida como trombocitopenia, detectada no grupo B, condiz com o esperado em relação a esse parâmetro no loxoscelismo. Em relação aos demais grupos, a proximidade entre as coletas sanguíneas, especialmente nos primeiros dias após o envenenamento, pode ter afetado os parâmetros hematológicos devido à perda de sangue no momento da coleta. Também pode explicar o porquê da elevação de alguns parâmetros hematimétricos nos tempos 7 e 14 dias, por haver mais tempo entre as coletas, acarretando menos efeitos deletérios na contagem das células periféricas. Contudo, os grupos D e E, que também receberam veneno, podem ter registrado variações nas contagens de PLT devido ao envenenamento. O grupo D não apresentou queda de PLT como o grupo B, indicando um possível efeito benéfico do secretoma nesse aspecto.

Ao observar o comportamento do grupo C, é possível perceber que não houve variação significativa com relação ao número de PLT. Sendo assim, o valor mais elevado deste grupo em relação ao grupo B nos tempos 48h e 72h pode ser atribuído à diminuição significativa desse parâmetro nos indivíduos envenenados, o que aumentou a diferença entre os grupos. Como não houve variação entre o grupo desafiado com solução salina 0,9% e tratado com secretoma e animais saudáveis, no grupo C, é difícil atribuir a ele um efeito direto nas PLT, levando a uma elevação na sua contagem. Entretanto, da mesma forma que o grupo E, o grupo D também teve contagem de PLT superior à do grupo B, o que sugere que o secretoma pode ter evitado a trombocitopenia ocasionada pelo veneno.

Nos primeiros 10 minutos após o envenenamento, há dano do endotélio de capilares, liberando mediadores químicos que desencadeiam vários eventos, como a agregação plaquetária para reparo do dano vascular (Vetter, 2013). Da Silva et al. (2003), ao analisar alterações hematológicas no sangue periférico e na medula óssea de coelhos submetidos ao envenenamento experimental, observaram trombocitopenia no sangue periférico, que se correlacionou com depressão de megacariócitos (tipo celular precursor de PLT) na medula óssea. A trombocitopenia e depressão medular foram detectadas a partir de 4h após o envenenamento e apresentaram recuperação a partir de 24h e 48h após envenenamento. Tavares et al. (2004), também utilizando coelhos no envenenamento experimental, observaram redução de PLT 3h após a aplicação do veneno, com recuperação às 72h e aumento na contagem de PLT (trombocitose) 120h depois. As cobaias também apresentaram trombocitopenia nos momentos iniciais após o envenenamento e a maioria dos grupos tinha contagem de PLT próximas às do tempo zero no tempo 72h, com exceção dos animais envenenados e tratados com secretoma. Igualmente, foi identificada trombocitose nos grupos B, D e E no tempo 7 dias.

Nos trabalhos de Da Silva et al. (2003) e Tavares et al. (2004), que foram realizados com coelhos, não foi observada anemia hemolítica ou alteração na contagem de ERI, Ht e Hb. Quadro hemolítico já foi bem estabelecido em camundongos (Tambourgi et al., 1998), humanos (Jacobs et al., 2022) e cobaias (Fernandes, 2024), sugerindo diferenças entre as espécies.

De Almeida (2022), ao analisar a medula óssea de coelhos desafiados com solução salina e tratados com secretoma por via ID, não observou alterações medulares significativas, indicando que não haver efeito direto do secretoma na medula óssea e, conseqüentemente, nas células sanguíneas periféricas. Coelhos desafiados com veneno de *L. intermedia* e tratados com secretoma por via ID também não apresentaram alterações medulares relevantes. Sendo assim, embora não seja observado um efeito isolado do secretoma, sua aplicação em indivíduos envenenados parece deixar a medula mais próxima do seu normal, sendo favorável na recuperação de alguns parâmetros hematológicos. Contudo, trata-se de espécie, dose e via de aplicação diferentes.

Há correlação entre o secretoma de neutrófilos e a ocorrência de trombose por mediação inflamatória (Blanch-Ruiz et al., 2021). Entretanto, trata-se de um tipo diferente de secretoma, liberado pelos neutrófilos em condições fisiológicas e patológicas, inviabilizando comparações.

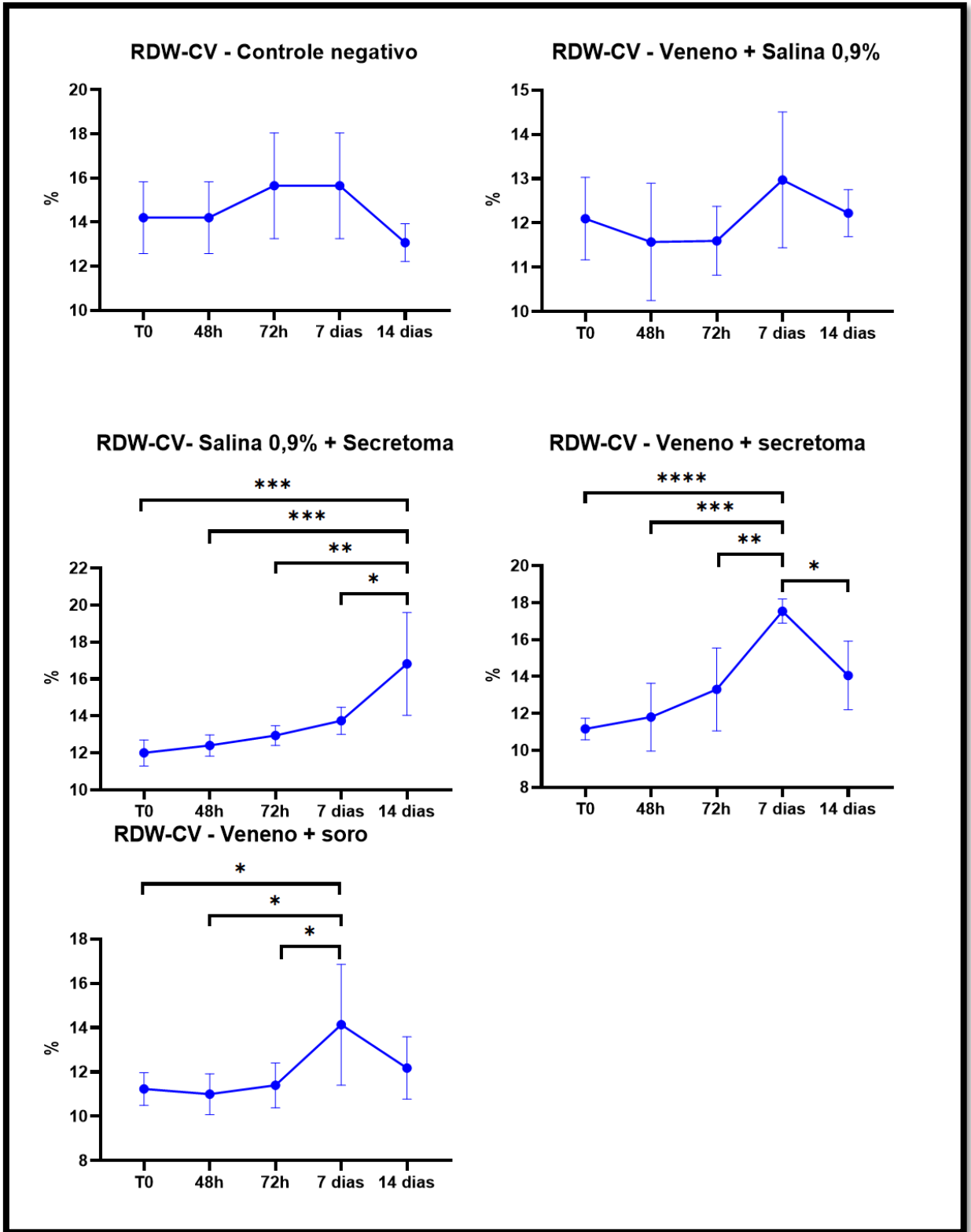


Figura 57. Valores médios de RDW-CV em cada grupo experimental durante o tempo de observação.

\*p < 0,05; \*\*p < 0,005; \*\*\*p < 0,003; p < 0,001.

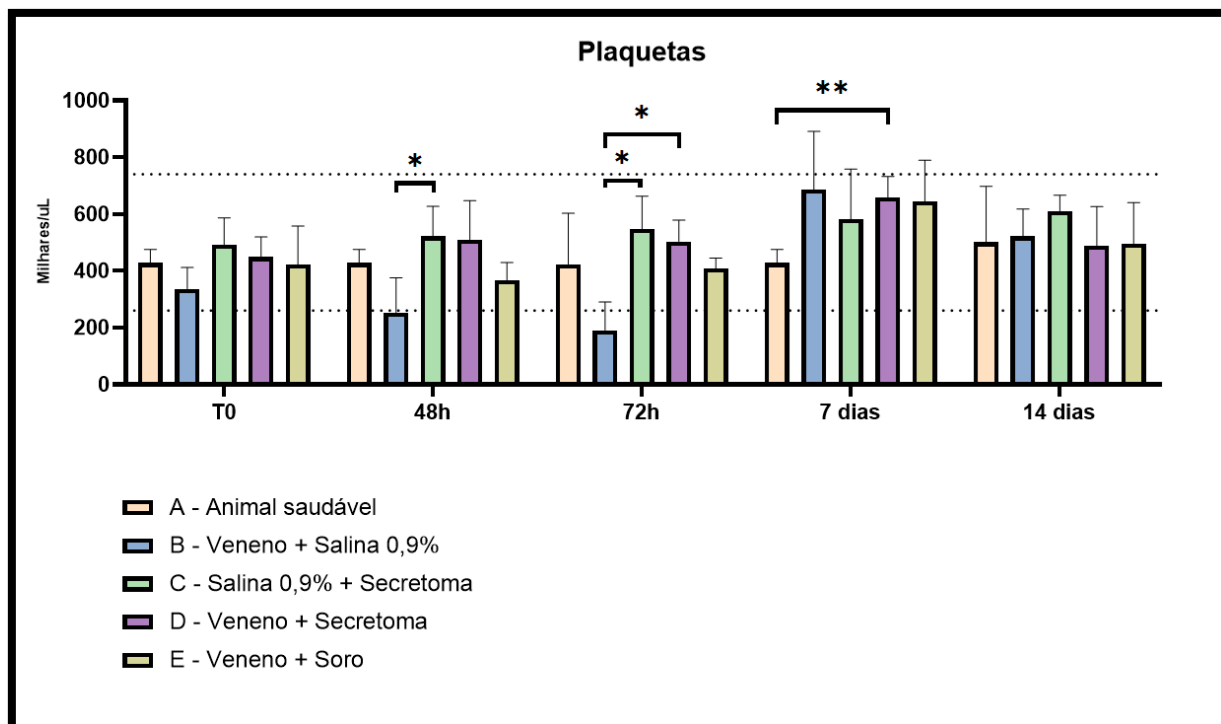


Figura 58. Valores médios da contagem de PLT nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.  
\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,005$ .

A figura 60 mostra a variação na contagem de LEU totais entre os diferentes grupos. Já na figura 61, observa-se a variação dos LEU totais ao longo do tempo em cada grupo experimental.

Entre os grupos, foram observadas diferenças significativas nos T0, 72h e 14 dias. Contudo, apenas o grupo D apresentou contagem de LEU totais inferior à referência da espécie, no tempo 14 dias.

Nos tempos, houve diferença nos grupos B, C e D. Nos animais desafiados com veneno e tratados com salina 0,9%, a contagem de LEU totais foi maior no tempo 48h em relação ao T0 e menor ao tempo 72h. No grupo C, a contagem de LEU totais foi significativamente menor nos tempos 48h e 14 dias em relação ao T0. No grupo D, o número de LEU totais foi menor no tempo 14 dias em relação aos demais tempos.

Foi possível observar que, no tempo 72h, as contagens de LEU nos grupos B e D apresentaram valores muito próximos. Isso mostra que o uso do secretoma como forma de tratamento do envenenamento loxoscélico não evitou a redução do número de LEU, que ocorreu semelhantemente à dos animais envenenados e tratados com solução salina 0,9%.

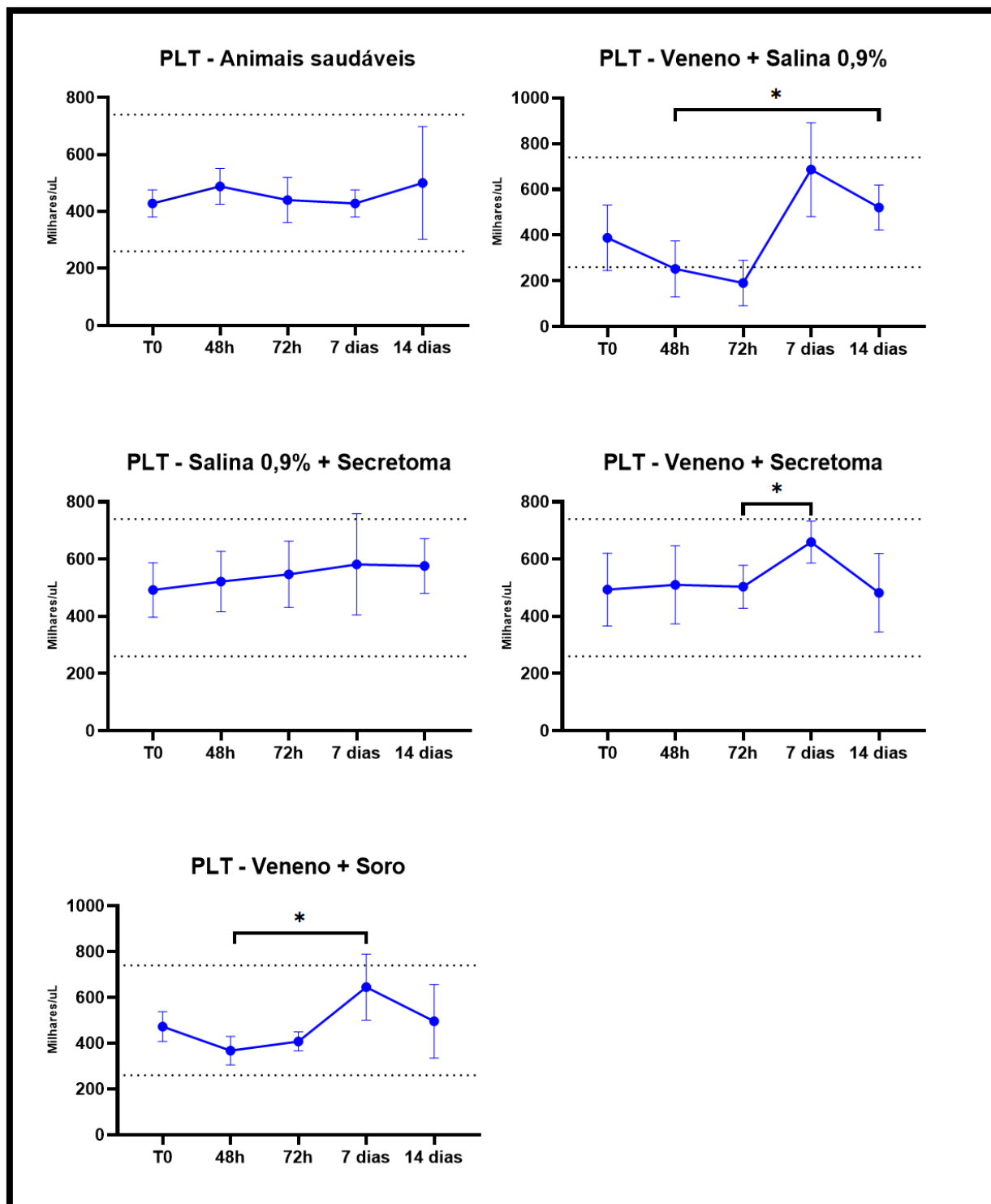


Figura 59. Valores médios da contagem de PLT em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ .

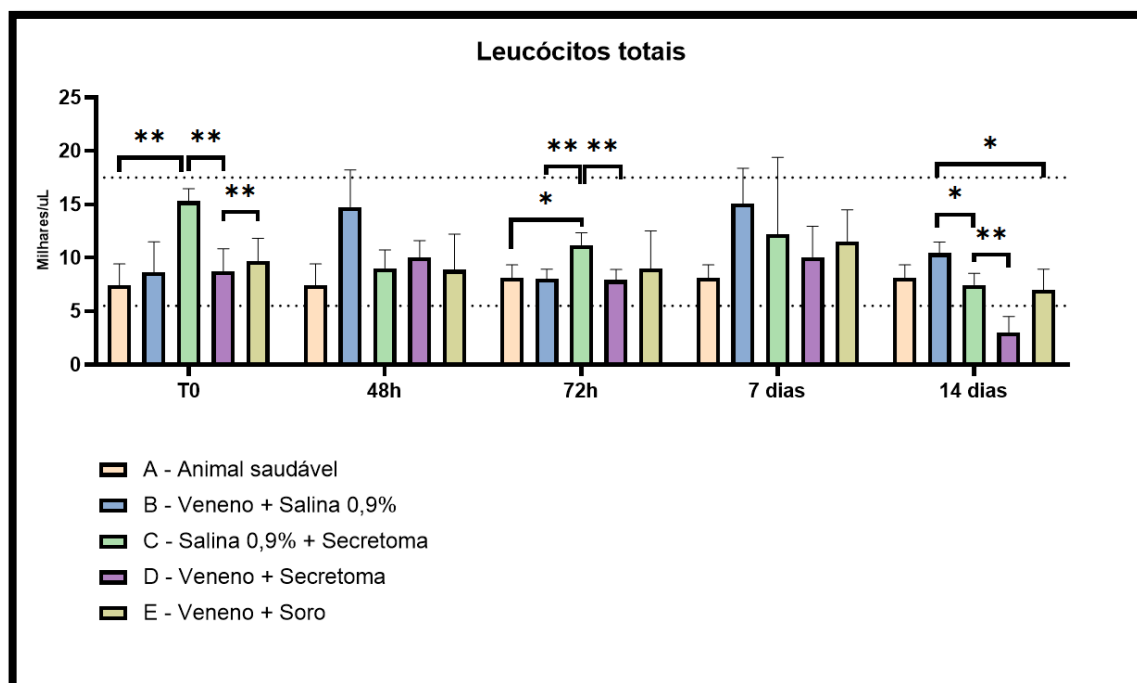


Figura 60. Valores médios da contagem de LEU totais nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,003$ .

Ainda, a redução significativa de LEU no grupo C pode indicar uma possível ação do secretoma na redução do número de células de defesa. A contagem de LEU no tempo 14 dias foi inferior à do T0, o que pode sugerir uma duração prolongada do seu efeito anti-inflamatório.

Aos 14 dias, o grupo B teve contagem de LEU totais superior à dos grupos C e D, sugerindo uma melhor recuperação dos animais envenenados e tratados com salina a 0,9% no que diz respeito a esse parâmetro.

O secretoma parece ter exercido um efeito imunossupressor, levando à diminuição dos LEU totais nos grupos que o receberam, tendo comportamento pior que o grupo B em relação a essas células. A diferença significativa entre os grupos C e D, no tempo 14 dias, mostra que a associação entre ambos exerceu efeito deletério na contagem de LEU.

Na figura 62 estão descritas as diferenças entre os grupos em relação à contagem de HET. Já na figura 63, se observam as variações na contagem de HET ao longo do tempo.

É possível observar diferença na contagem de HET apenas no tempo 7 dias, em que o grupo E apresentou número de HET significativamente maior que o grupo D (veneno + secretoma). Na comparação dos grupos nos diferentes tempos, não foram encontradas variações significativas.

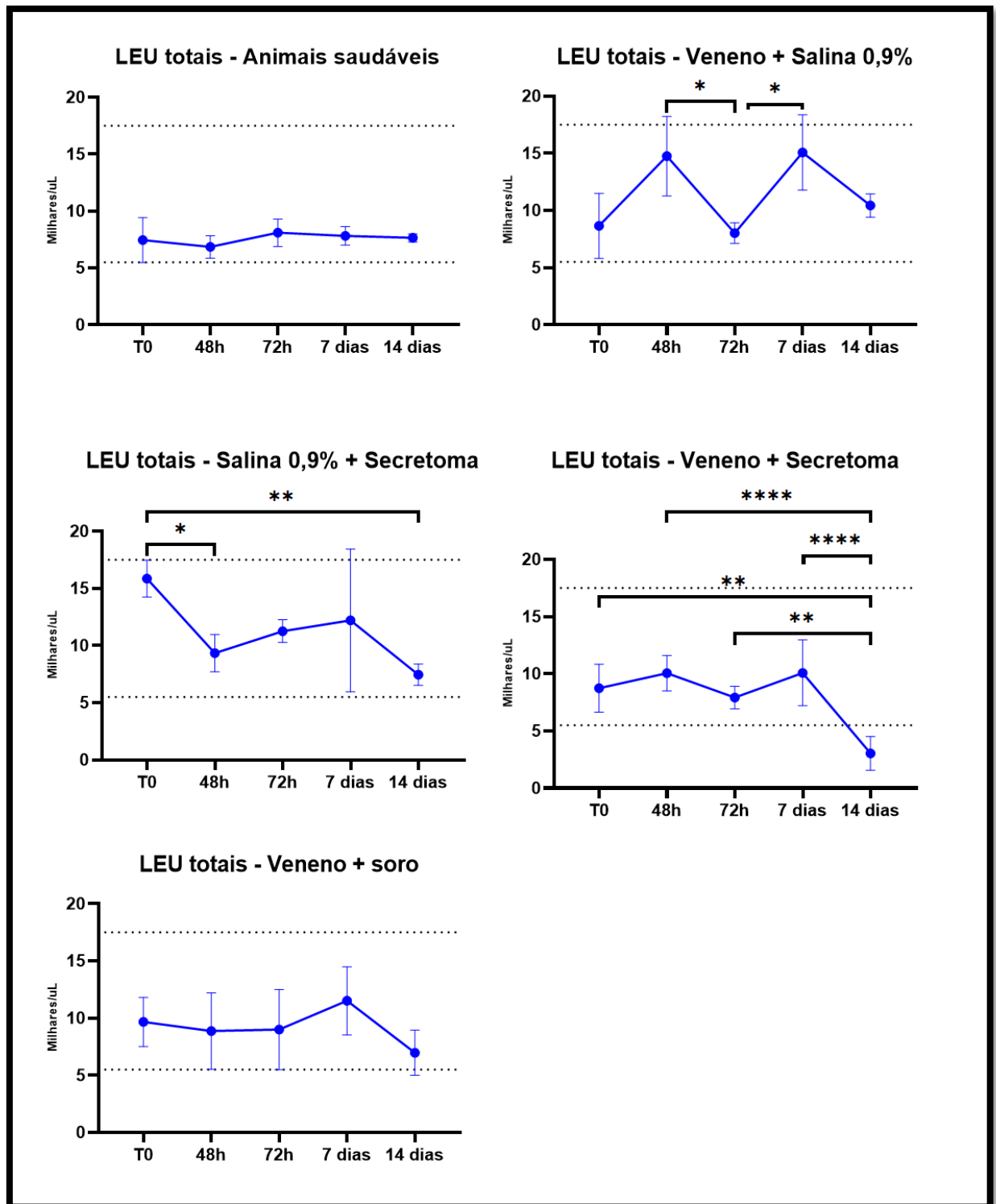


Figura 61. Valores médios da contagem de LEU totais em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.  
 \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,003$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ .

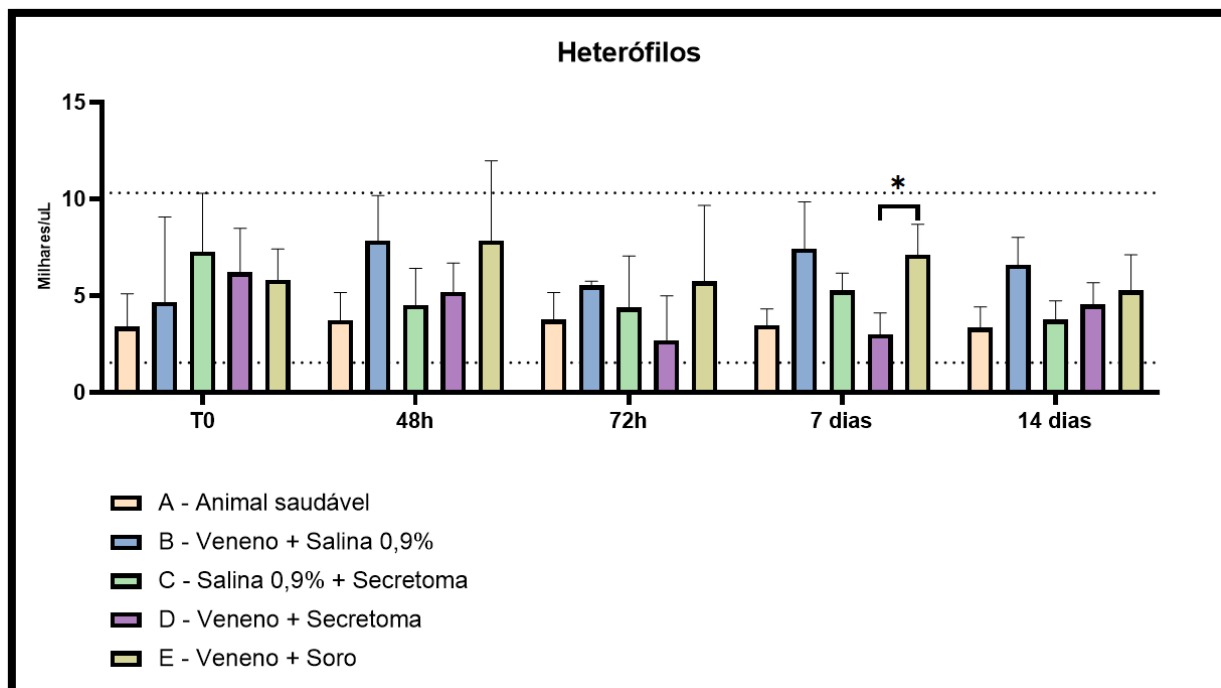


Figura 62. Valores médios da contagem de HET nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie  
\* $p < 0,05$ .

Os HET são um tipo de célula de defesa presente na corrente sanguínea de cobaias e equivalem aos neutrófilos presentes em outras espécies. No leucograma de cobaias saudáveis, a contagem de LINF é superior à de HET, sendo este o padrão de normalidade dessa espécie (Siegel & Walton, 2020).

Observa-se que o número de HET se manteve constante no grupo A (salina 0,9% + salina 0,9%) e sofreu oscilações nos demais grupos. Ao avaliar o leucograma completo dos animais do estudo, foi observada uma quantidade maior de HET no sangue periférico do que de LINF, caracterizando uma resposta inflamatória.

A diferença registrada no tempo 7 dias se correlaciona com as variações na contagem de LEU, que apresentou redução mais acentuada no grupo D do que no grupo E. Como os HET foram os LEU em maior quantidade, tal observação era esperada e condiz com os demais dados obtidos.

Ressalta-se que uma resposta inflamatória foi deflagrada nos grupos do estudo, com exceção dos animais saudáveis. Nos grupos C e D, percebe-se a redução na contagem de HET. É importante considerar que o hemograma normal da espécie apresenta quantidade maior de LINF.

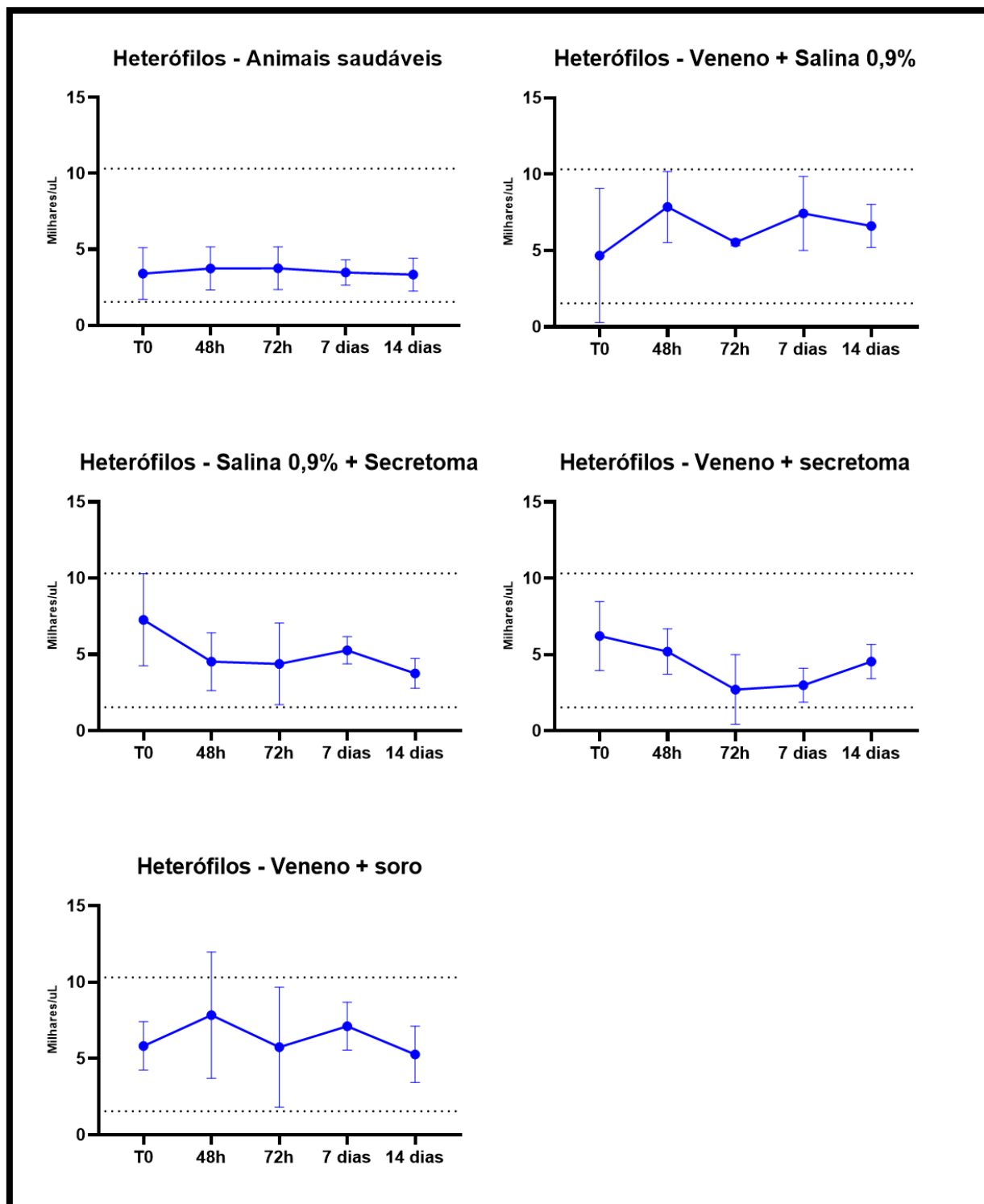


Figura 63. Valores médios da contagem de HET em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

O envenenamento loxoscélico é caracterizado por leucocitose, infiltração de polimorfonucleares, hemorragia e edema no local da picada, fundamentais para o desenvolvimento da dermonecrose (Tambourgi et al., 2005). O veneno exerceu tal ação no B, mas os mesmos efeitos não foram identificados nos D e E. O efeito anti-inflamatório do

secretoma é uma possibilidade para este resultado. Já no grupo E, atribui-se o resultado à ação do antiveneno (soro anti-loxoscélico).

Não foram identificadas diferenças relevantes entre os grupos em relação à contagem de LINF, EOS e MON (figuras 64, 65 e 66). Em cada grupo experimental, houve diferença na contagem de LINF (Figura 67) e MON (Figura 68). Não houve diferença na contagem de EOS (Figura 69).

O grupo B teve número total de LINF maior no tempo 7 dias do que no tempo 72h, indicando redução do processo inflamatório e conseqüente retorno do hemograma ao padrão de normalidade da espécie. Entretanto, o grupo E teve uma contagem de LINF inferior no tempo 14 dias, sugerindo uma quimiotaxia maior de heterófilos para a corrente sanguínea.

O número de MON foi significativamente maior no tempo 48h em comparação ao T0 no grupo B. Embora a monocitose seja um achado incomum no loxoscelismo, pois se correlaciona a processos infecciosos e inflamatórios crônicos (Pichardo-Rodriguez et al., 2020), sua ocorrência pode ser em virtude da migração das células de defesa no local da inoculação.

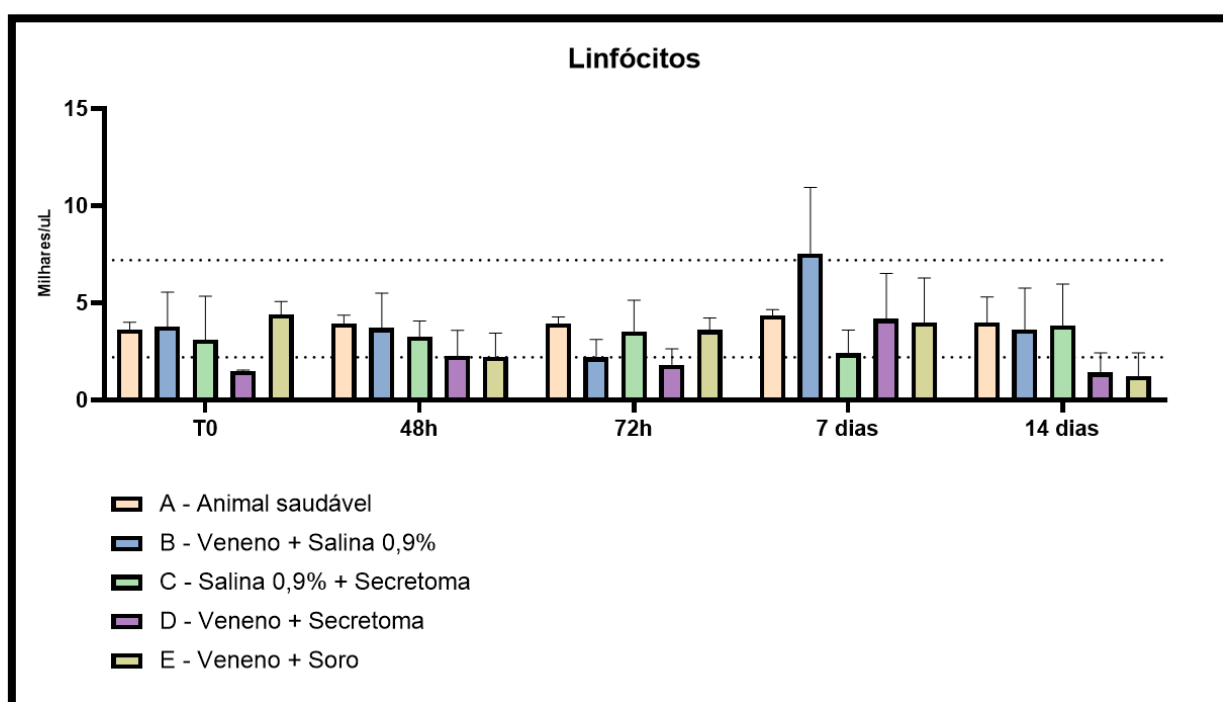


Figura 64. Valores médios da contagem de LINF nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

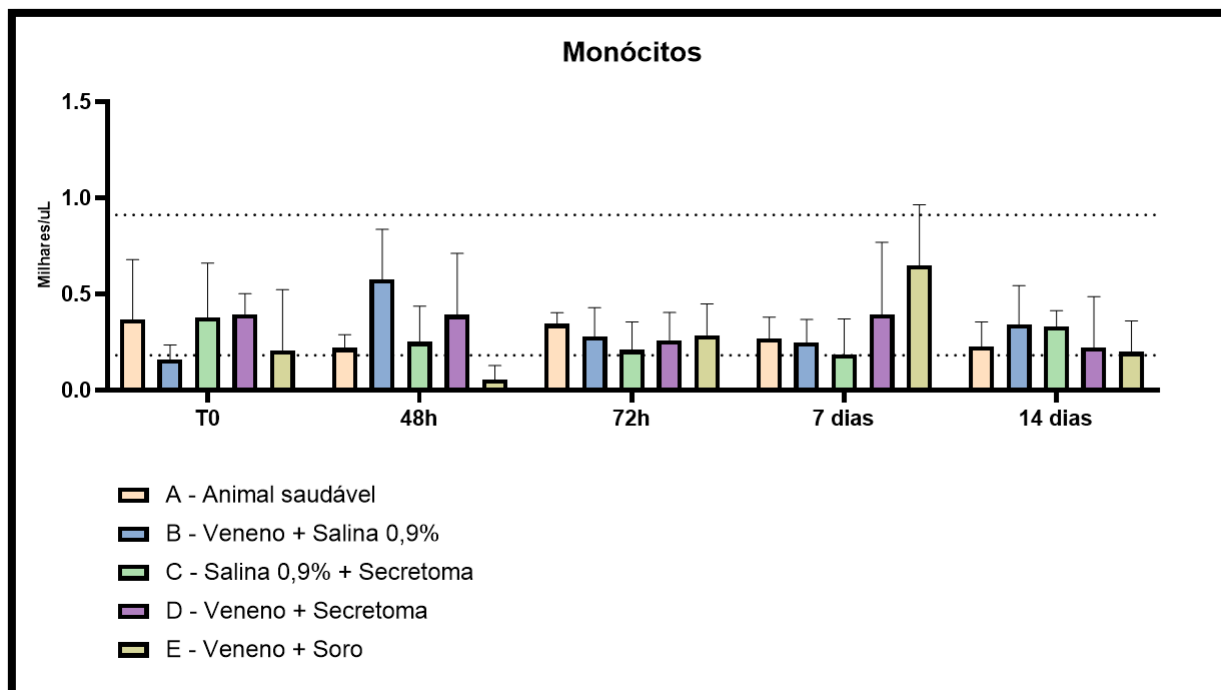


Figura 65. Valores médios da contagem de MON nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

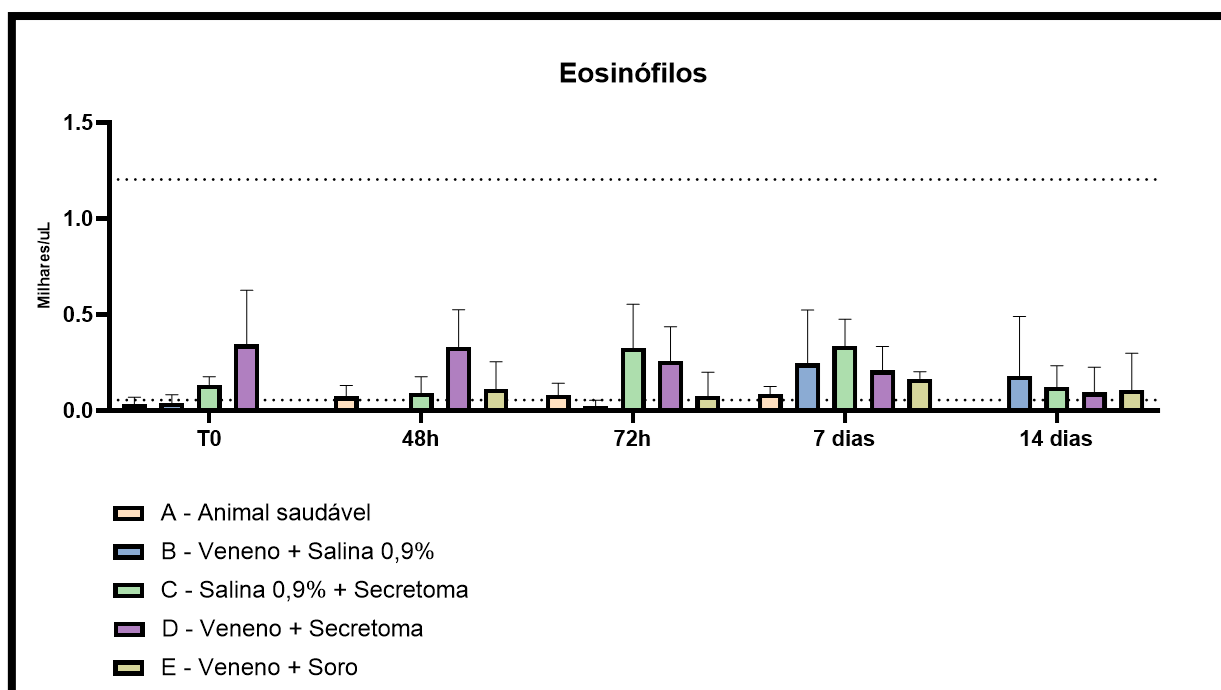


Figura 66. Valores médios da contagem de EOS nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

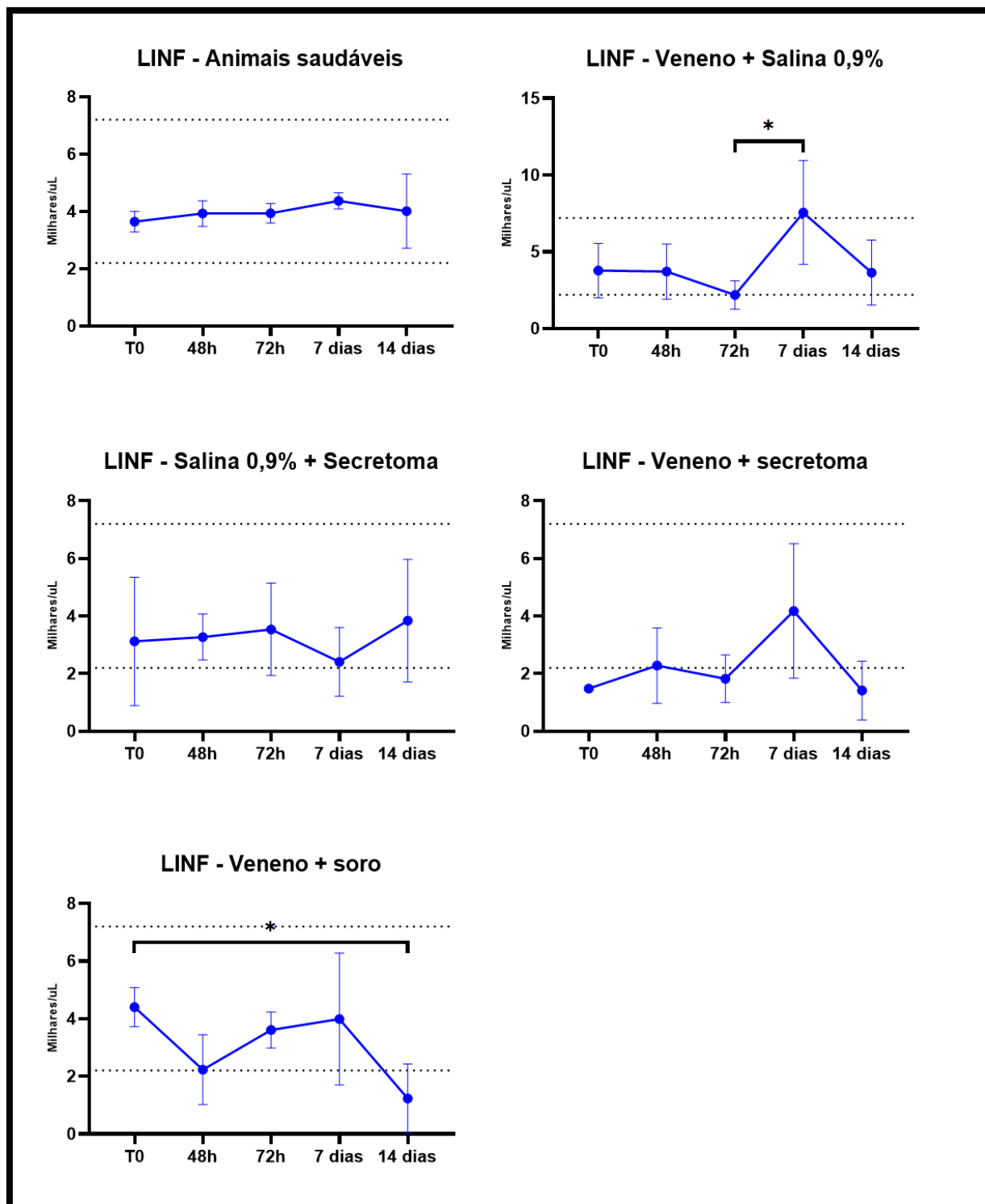


Figura 67. Valores médios da contagem de LINF em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

\* $p < 0,05$ .

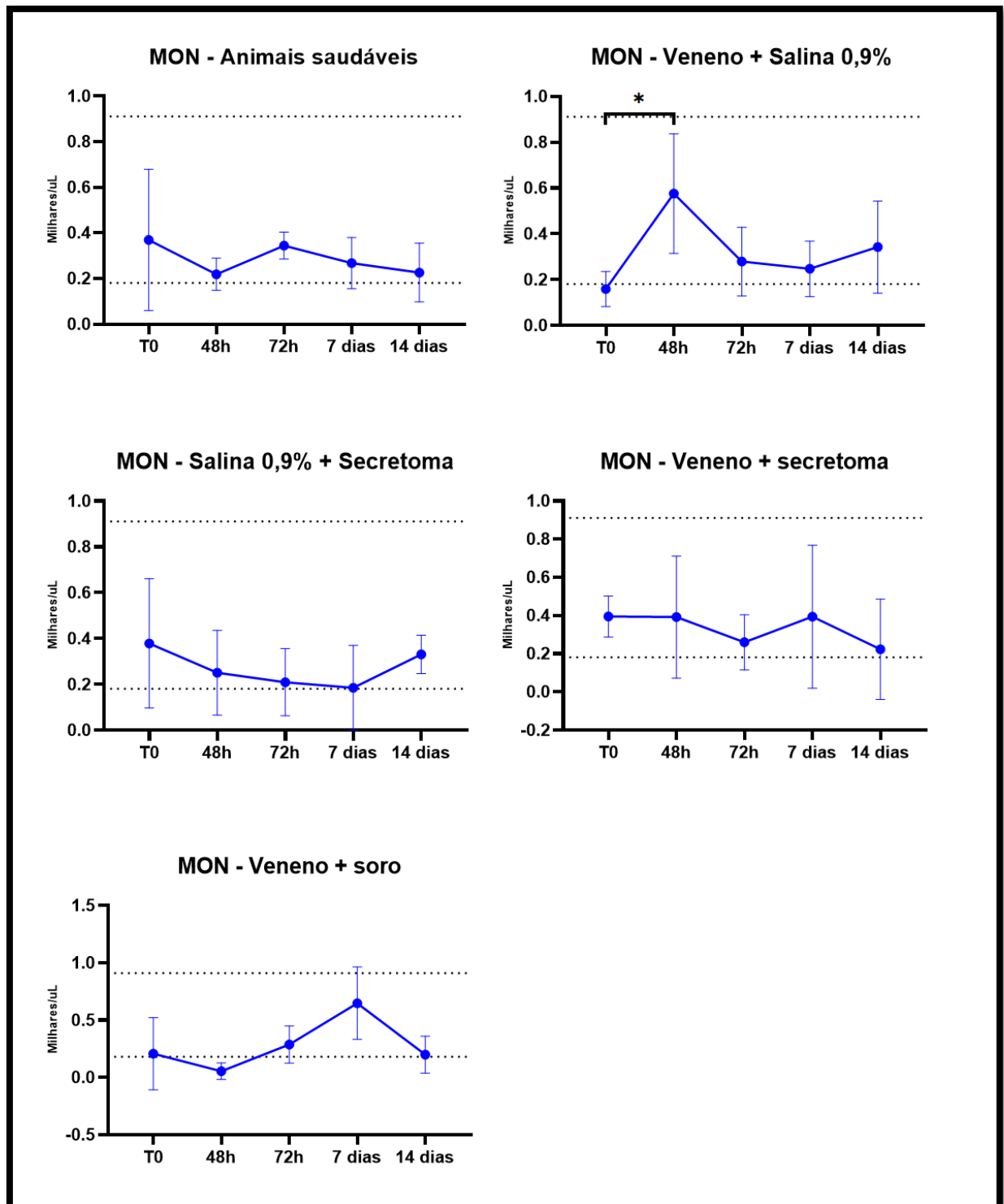


Figura 68. Valores médios da contagem de MON em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

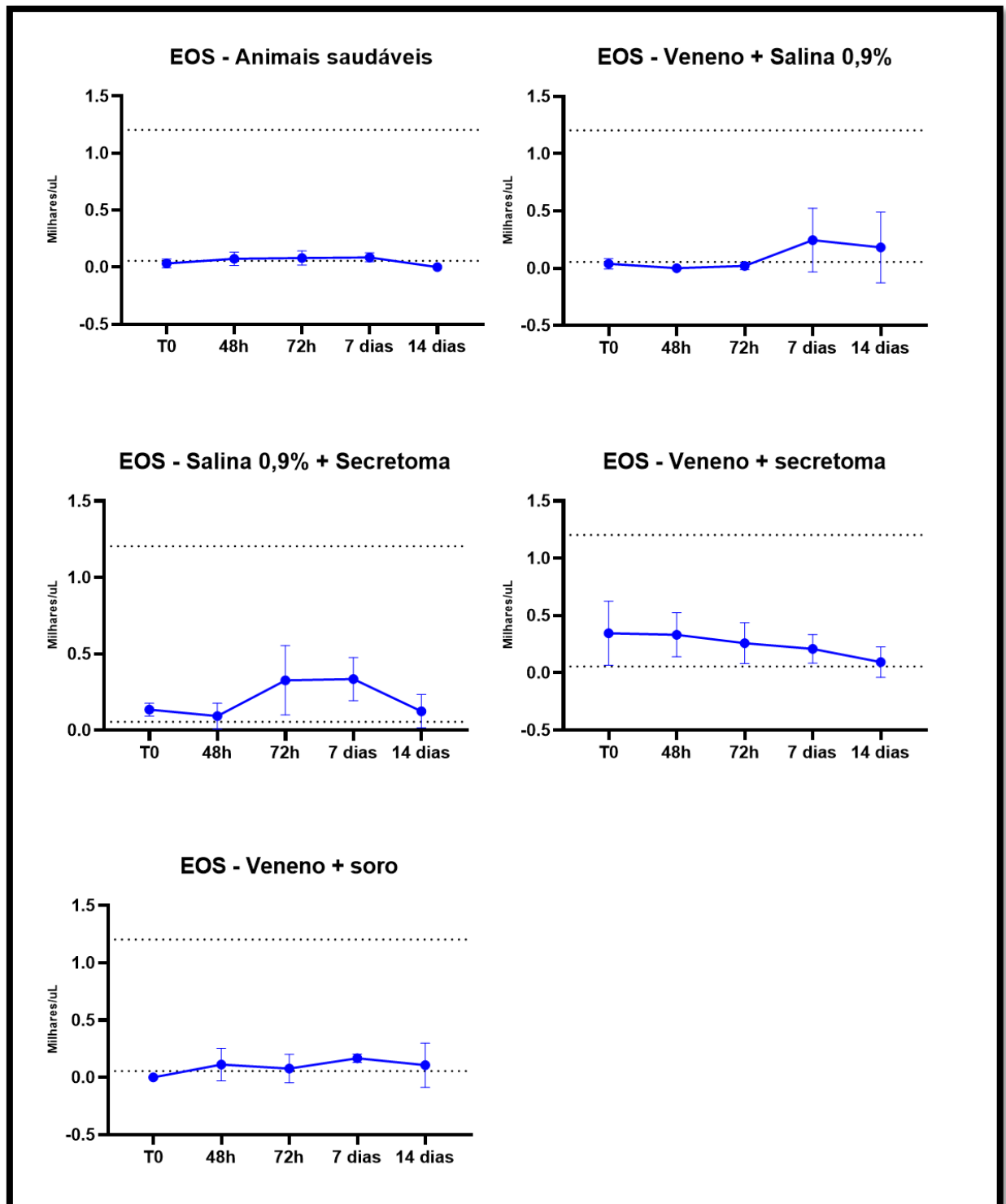


Figura 69. Valores médios da contagem de EOS em cada grupo experimental durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

### 5.3.2. Exames bioquímicos plasmáticos

A avaliação dos níveis de CK-MB não mostrou diferença entre os grupos, conforme representado na figura 70. Os valores foram comparados nos T0, 7 e 14 dias.

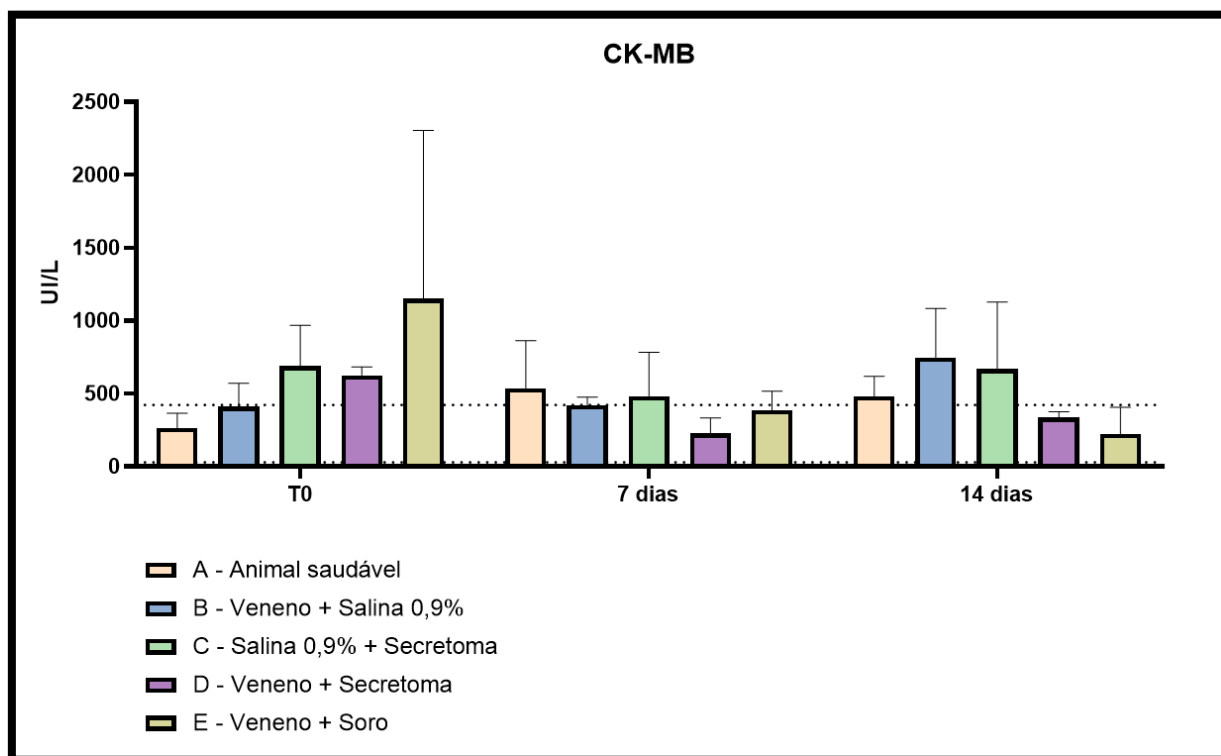


Figura 70. Variações na concentração de CK-MB nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

A enzima CK está presente em diferentes tecidos do organismo e pode ser mensurada no soro. Sua fração MB é encontrada no coração e pode ser liberada na corrente sanguínea em casos de injúria miocárdica (Ghosh et al., 2023). Embora não haja diferença entre os grupos no que se refere a esse parâmetro, se forem considerados os valores de referência da espécie, percebe-se que houve elevação da concentração sérica de CK-MG em alguns grupos nos diferentes tempos. O intervalo de referência das cobaias é de 29 - 422,68 U/L (Botelho et al., 2016). No T0, observam-se valores acima de 500U/L em todos os grupos, com exceção do controle negativo. No tempo 7 dias, ainda há oscilação nos níveis de CK-MB, mas em menor escala. Aos 14 dias, os valores de CK-MB foram mais elevados nos grupos B e C.

Os resultados de CK-MB obtidos podem ter sofrido interferência de outros fatores além da possibilidade de lesão cardíaca, uma vez que havia níveis elevados no T0. Fatores como o material utilizado para análise (plasma), hemólise, tempo de armazenamento das amostras e método utilizado podem ter levado a diferenças do valor de referência.

Com relação à cTnI, também não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos, como visto na figura 71. Troponinas são proteínas que participam da contração muscular. No coração, estão presentes I, T e C. Existem testes para mensuração das subunidades I e T. Quando há lesão cardíaca, ocorre aumento das concentrações das troponinas na corrente sanguínea (Saviñon-Flores et al., 2022).

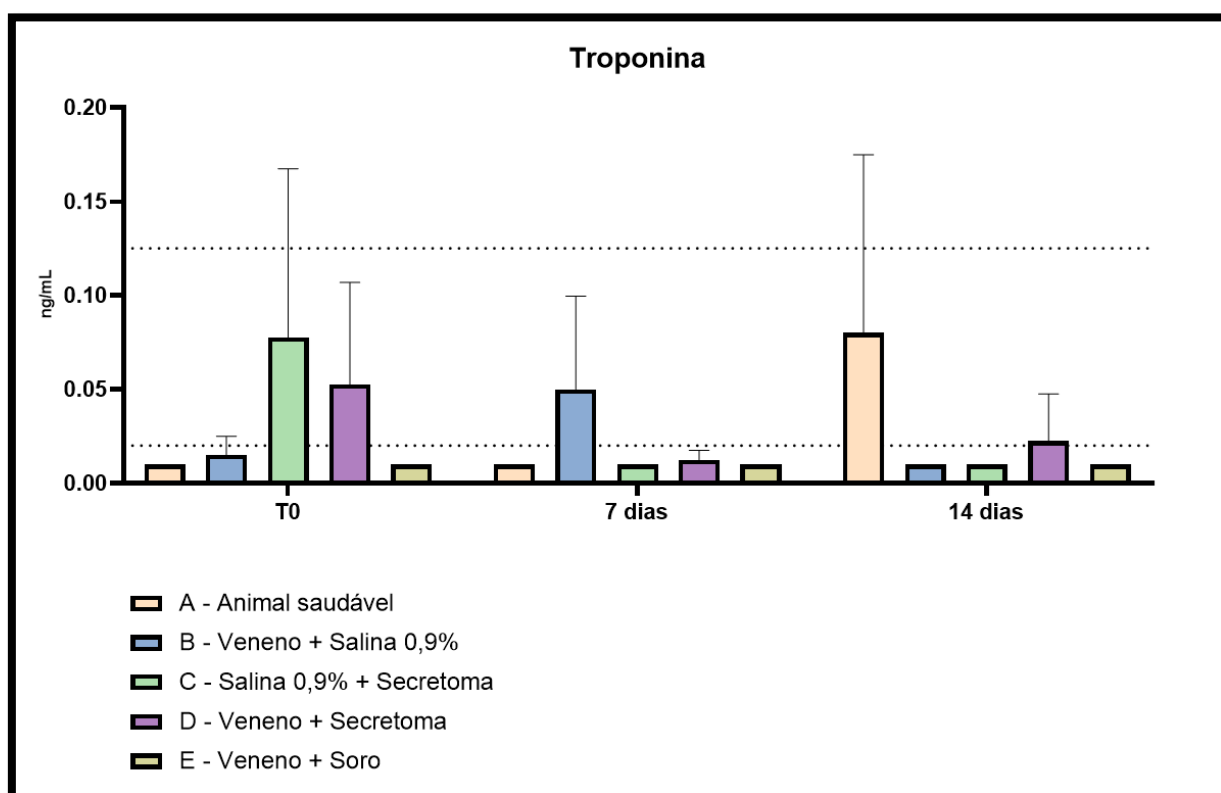


Figura 71. Valores médios da concentração de cTnI nos diferentes grupos experimentais durante o tempo de observação. Linhas pretas pontilhadas demarcam o intervalo de referência da espécie.

Os valores de referência de cTnI para cobaias variam entre 0,2 e 12,5ng/mL, conforme descrito no Quadro 4. Considerando isso, percebe-se que alguns grupos tinham indivíduos com valor acima da normalidade no T0, assim como elevação no tempo 14 dias. Semelhantemente à CK-MB, fatores como material usado, tempo entre coleta e análise e método bioquímico de avaliação podem ter gerado divergências entre o descrito na literatura e os achados obtidos. Contudo, o grupo A apresentou valores dentro da normalidade no T0 e valores elevados no tempo 7 dias, com normalização aos 14 dias, o que pode se relacionar com as possíveis interferências mencionadas.

Os animais também não apresentaram alterações nos níveis de NT-proBNP. Todos apresentaram valores inferiores a 500mmol/L, abaixo da capacidade de leitura do teste. Sendo assim, não foram considerados relevantes.

#### 5.4.Exames anátomo-histopatológicos

Foi realizado o estudo histológico da pele e do coração. Todos os materiais destinados à avaliação histopatológica foram coletados 14 dias após o início do experimento, momento em que os animais foram eutanasiados.

Para fins de classificação da gravidade dos achados histopatológicos e comparação da intensidade das lesões entre os grupos, foi realizado um escore para graduar as observações da microscopia. Sendo assim, a pontuação 0 indica ausência de lesão; 1 indica lesão discreta; 2 indica moderada e 3 indica intensa. Os pontos foram atribuídos a cada lâmina e posteriormente ao grupo. Algumas lesões foram tão discretas que podem não ser representadas graficamente.

##### 5.4.1. Pele

Na avaliação macroscópica da pele, não foram observadas lesões de pele intensas em nenhum dos grupos. Conforme já mencionado, Fernandes (2024), testando diferentes doses de veneno loxoscélico em cobaias, encontrou lesões de pele mais significativas a partir de 15 $\mu$ g de veneno, o que é compatível com os resultados aqui obtidos, evidenciados nas figuras 72 e 73.



Figura 72. Lesões macroscópicas na pele das cobaias. A. Animal saudável após tricotomia e aplicação de ID de solução salina. B. Animal do grupo B seis horas após aplicação ID de veneno. C. Animal do grupo D seis horas após aplicação ID de veneno. D. Animal do grupo E 30min após aplicação de veneno e de soro antiloxyloscélico.



Figura 73. Lesão hiperêmica discreta na pele de cobaia do grupo C.

Após 48h de aplicação, a maioria dos animais já apresentou melhora no padrão da lesão de pele, que evoluiu para resolução completa após sete dias de experimento em todos os grupos.

No estudo microscópico, não foram observadas alterações significativas na pele da maioria dos animais saudáveis, enquanto outros tinham infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com raros HET. Os achados podem ser em decorrência do processo inflamatório deflagrado no local de aplicação da solução salina. Ainda, a tricotomia efetuada previamente à aplicação pode ter contribuído para lesões de pele e pelo. Observam-se imagens histológicas na figura 74.

No grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%, os achados foram variáveis entre os indivíduos do grupo. Alguns animais apresentaram alterações discretas e outros, intensas. Nas cobaias com lesões brandas, a localização dos achados foi na derme superficial. Foi identificada a presença de infiltrado linfoplasmocitário multifocal discreto, infiltrado linfoplasmocitário multifocal a coalescente discreto, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e heterofílico discreto, além de HET em vasos da derme profunda. Nos indivíduos com lesões mais graves, a localização predominante foi na derme profunda e subcutâneo, associando-se às fibras musculares. Observou-se infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário e heterofílico

difuso e intenso, ocasionais heterófilos degenerados, com expansão para o músculo cutâneo, áreas de degeneração e perda de estriação de fibras associada a infiltrado de HET íntegros e degenerados. Observam-se imagens histológicas na figura 75.

Os resultados no B se assemelham ao descrito na literatura. Observam-se variações de acordo com a espécie, a quantidade de veneno (conhecida apenas em estudos experimentais) e o tempo de avaliação da lesão.

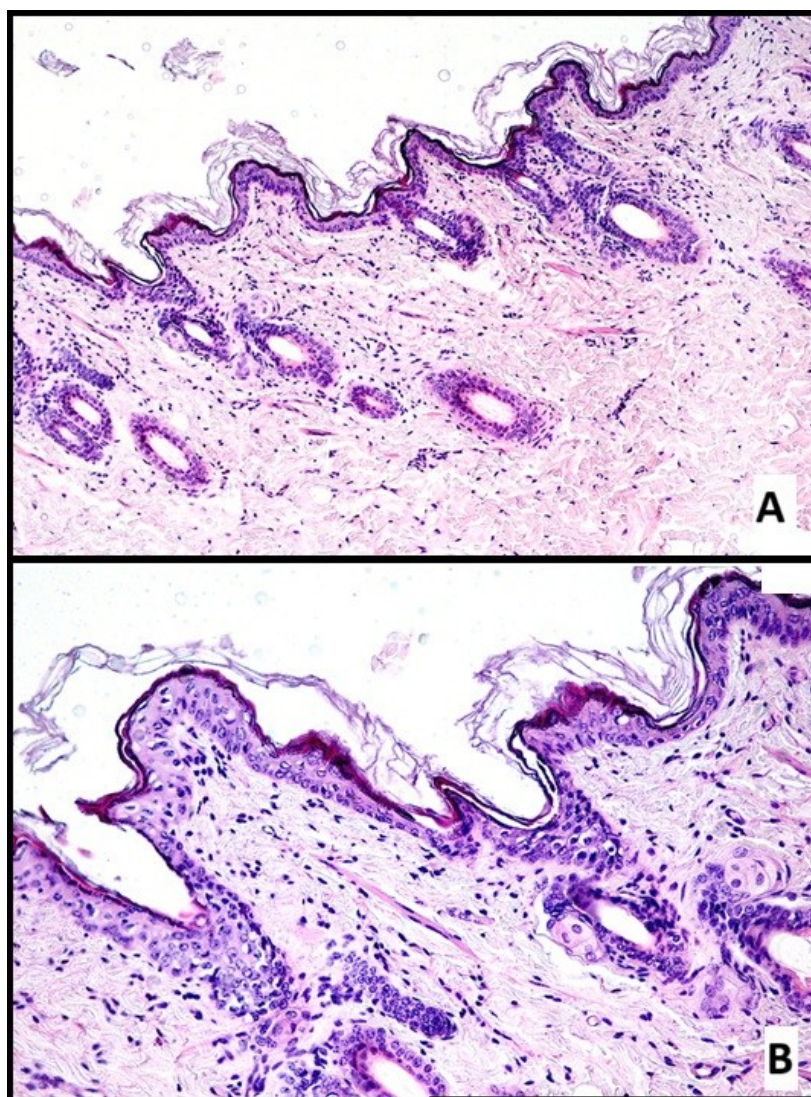


Figura 74. Microscopia óptica da pele de cobaia hígida. Observa-se pele íntegra em A (HE, 10x) e B (HE, 20x).

Pereira et al. (2012) aplicaram 0,5 $\mu$ g de veneno de *L. similis* por via ID em coelhos e coletaram fragmentos de pele duas, quatro, seis e oito horas após a injeção. Foram identificados, de forma semelhante às cobaias, infiltrado heterofílico, edema e necrose do músculo cutâneo. Também foram observadas angiectasia, exsudato fibrinoso e degeneração fibrinóide, que

diferem do presente estudo. Ospedal et al. (2002), avaliando a pele de coelhos cinco dias após a administração ID de 40 $\mu$ g de proteínas de um *pool* de veneno loxoscélico, encontraram necrose extensa na epiderme e regiões adjacentes, miólise, pontos de calcificação e infiltrado neutrofílico extenso, lesões mais intensas que as presentes nas cobaias. No trabalho de Fernandes (2024), realizado com cobaias que receberam doses entre 11 e 350 $\mu$ g de veneno de *L. intermedia*, e com coleta 72h após a injúria, foram observados infiltrados linfo-plasmocitário e heterofílicos e necrose. De modo geral, a intensidade das lesões foi proporcional à dose aplicada. A cobaia que recebeu 14 $\mu$ g de veneno, mesma dose utilizada no presente estudo, não apresentou alterações significativas, o que pode sugerir que essa dose não gera efeitos tão importantes na pele. Entretanto, os indivíduos que receberam 11 e 12 $\mu$ g tinham infiltrado e edema discretos. É importante considerar a variação individual, idade dos animais e tempo de coleta na interpretação.

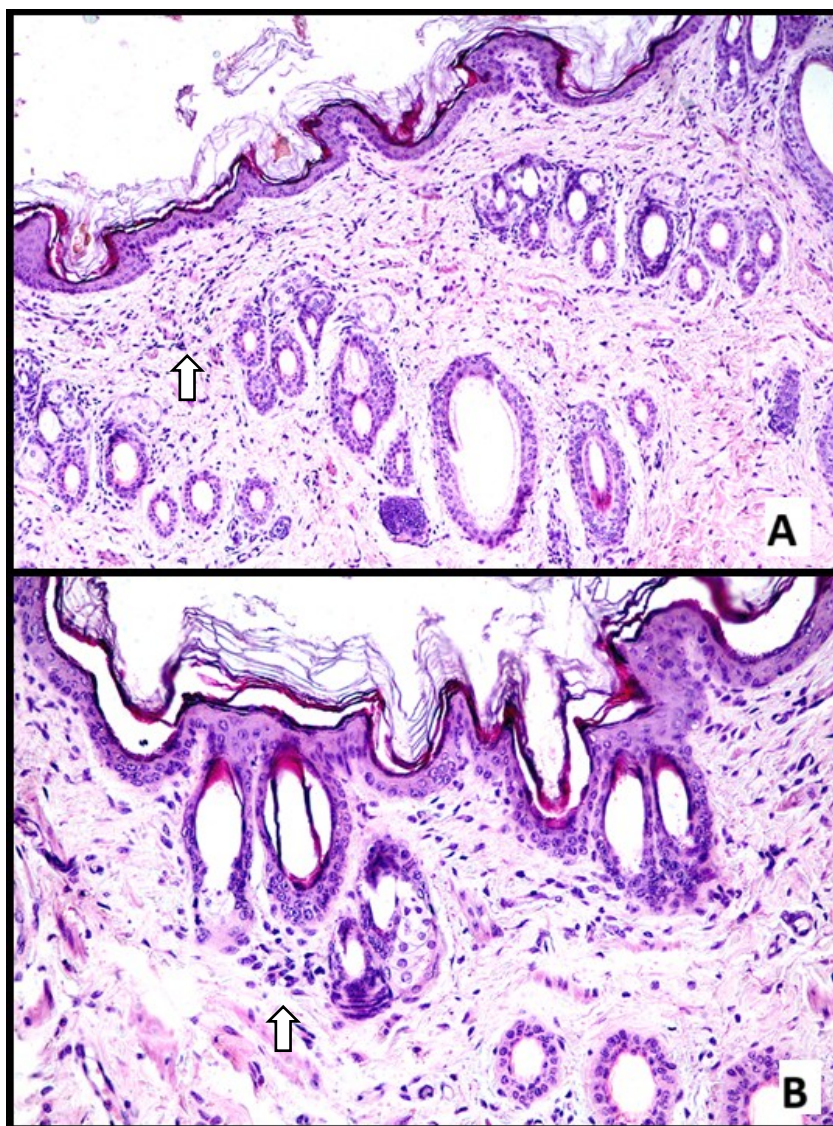


Figura 75. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo B (veneno + salina 0,9%). A. Observa-se a presença de infiltrado inflamatório apontado pelas setas brancas em A (HE, 10x) e B (HE, 20x).

O grupo C, desafiado com solução salina e tratado com secretoma por cinco dias consecutivos, por via IP, também apresentou lesões de pele variáveis. Houve animais sem alterações histopatológicas, assim como outros com infiltrado linfo-plasmocitário discreto na derme superficial; derme com dois focos de infiltrado de macrófagos e célula multinucleada circundando folículo piloso; área focal com acúmulo de HET no epitélio (pústula subcorneal). Tais achados se correlacionam com a aplicação ID de solução salina, capaz de incitar um processo inflamatório. Sendo assim, os achados podem não ter relação direta com o uso do secretoma. De toda forma, o secretoma, que pode ter ação inflamatória, uma vez que pode reduzir e aumentar o nível de determinados mediadores inflamatórios (Sari et al., 2023), pode ter exacerbado as lesões. Observam-se imagens histológicas na figura 76.

A literatura é escassa a respeito dos efeitos do secretoma numa pele saudável. Além disso, a aplicação do secretoma foi IP, o que dificulta avaliar sua ação numa injeção de solução salina, que possui um potencial baixo de causar dano. Há estudos que demonstram seu uso no tratamento antienvhecimento, em modelos *in vitro* e *in vivo*, nos quais se observam desfechos positivos nos indivíduos que o recebem (Li et al., 2020; Damayanti et al., 2021; Hani et al., 2023). Contudo, a aplicação é feita diretamente no tipo celular estudado ou na pele, o que difere da administração sistêmica e seus consequentes efeitos. Ainda, é possível considerar fatores como contaminação no local da ferida, embora tenham sido tomadas as medidas de antissepsia e não foram observadas feridas macroscopicamente. O estresse de manipulação também pode ter contribuído para um processo inflamatório mais intenso do que seria em outras condições.

O grupo D apresentou desde lesões de pele discretas até lesões mais intensas. Os achados foram semelhantes aos do controle positivo e se correlacionam ao descrito na literatura. Alguns animais tinham infiltrado linfo-plasmocitário e heterofílico multifocal discreto na derme superficial e infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário e heterofílico multifocal a coalescente moderado na mesma localização. Foi identificado infiltrado inflamatório linfo-histio-plasmocitário e heterofílico difuso e intenso, com ocasionais HET degenerados no subcutâneo, com expansão para o músculo cutâneo, com áreas de degeneração e perda de estriação de fibras musculares associada a infiltrado de HET íntegros e degenerados. Ainda havia área focalmente extensa com acúmulo de grande quantidade de HET íntegros e degenerados na derme profunda, com macrófagos com citoplasma vacuolizado e presença de células multinucleadas. Observam-se imagens histológicas nas figuras 77 e 78.

Por fim, o grupo E foi o que mais se assemelhou aos animais saudáveis. Alguns animais não apresentaram alterações histopatológicas significativas e outros tinham lesões discretas, como infiltrado linfo-plasmocitário multifocal discreto na derme superficial, hiperqueratose hiperqueratótica difusa discreta e infiltrado linfo-histiocitário discreto ao redor de folículos pilosos. Tal resultado evidencia que o veneno preveniu o desenvolvimento de dermonecrose. Observam-se imagens histológicas na figura 79.

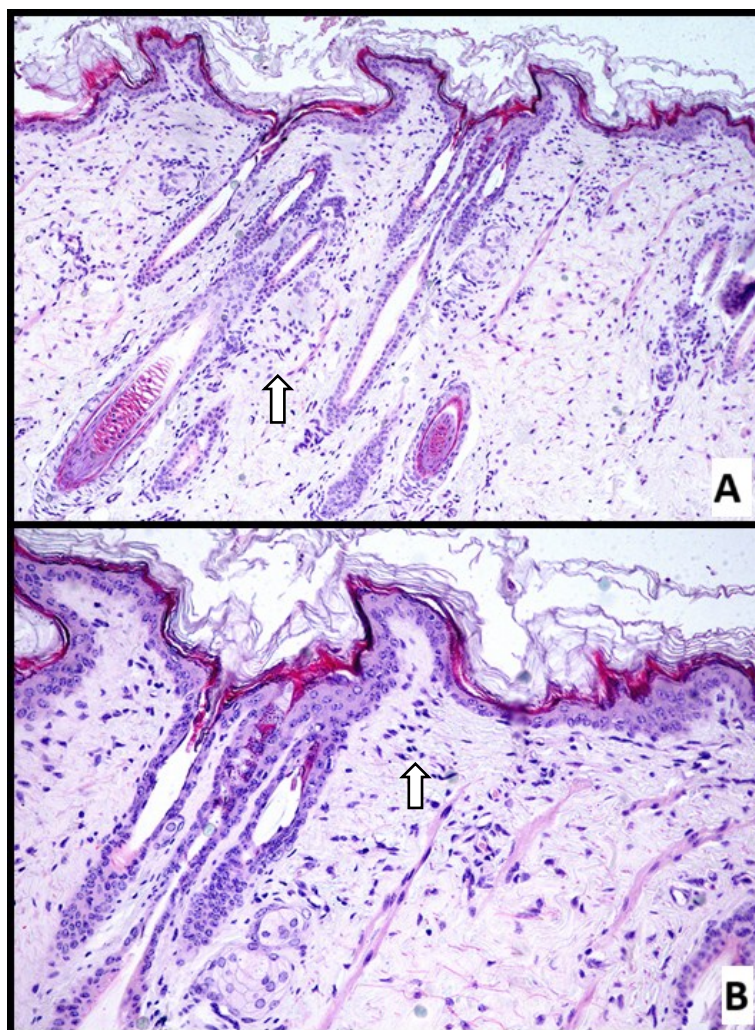


Figura 76. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo C (salina 0,9% + secretoma). A. Observa-se a infiltração inflamatória na derme superficial apontada pela seta branca em A (HE, 10x) e B (HE, 20x)

Tendo como base o escore de graduação das lesões, foi efetuada a comparação entre os grupos, conforme pode ser observado na figura 80. O grupo D foi o que obteve escore de lesões mais alto, o que gerou uma diferença significativa entre este e o E, que teve escore mais baixo de lesões.

Tais achados sugerem que o secretoma não foi eficaz na prevenção ou tratamento da dermonecrose ocasionada pelo envenenamento. Já o soro antiloxoscélico, padrão-ouro de tratamento na medicina humana, teve bons resultados.

O secretoma é amplamente utilizado em estudos *in vitro*, *in vivo*, bem como em ensaios clínicos no tratamento de feridas, com resultados promissores. Dessa forma, a maior intensidade de lesões no grupo D difere do esperado.

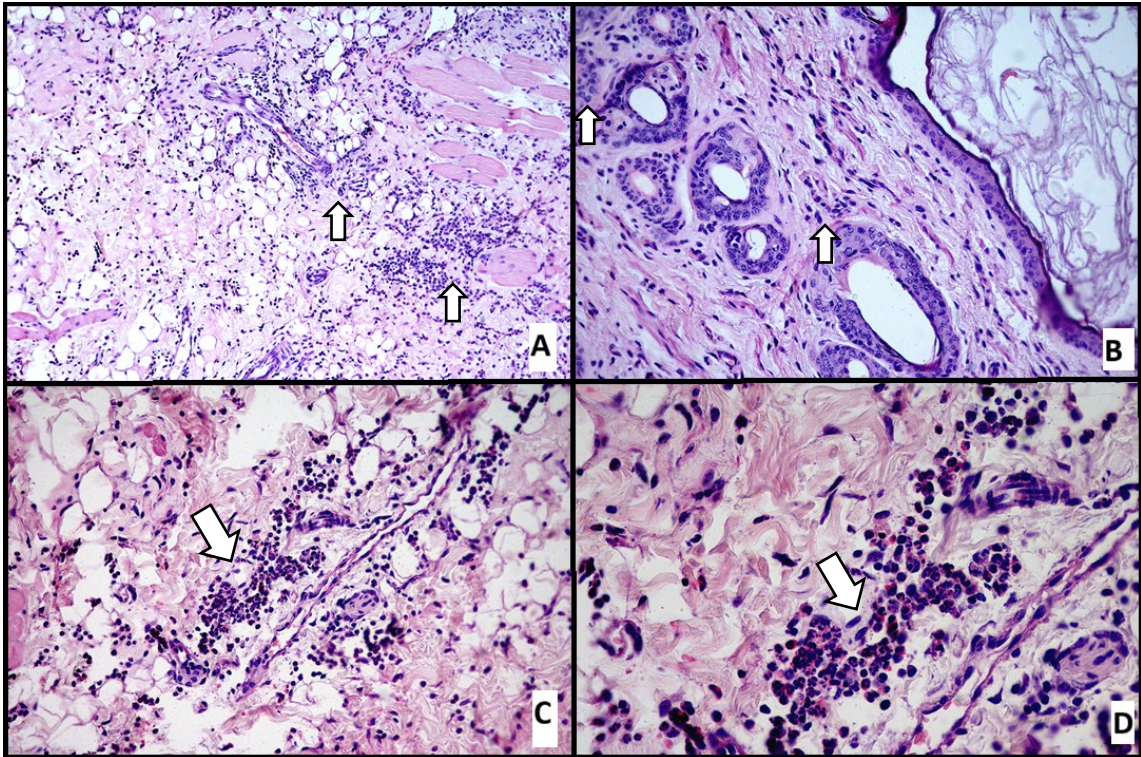


Figura 77. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo D (veneno + secretoma). A. Corte histológico do subcutâneo, mostrando infiltrado inflamatório intenso, apontado pelas setas brancas (HE, 10x). B. Corte histológico da derme superficial evidenciando infiltrado inflamatório apontado pelas setas brancas (HE, 20x). C. Corte histológico do subcutâneo mostrando infiltrado inflamatório moderado apontado pela seta branca (HE, 20x). D. Corte histológico, evidenciando infiltração inflamatória intensa apontada pela seta branca (HE, 40x).

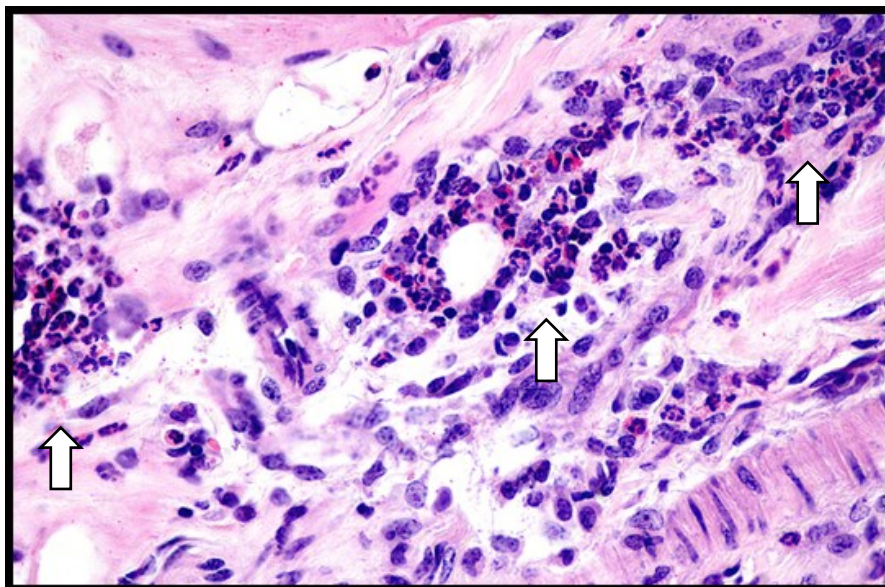


Figura 78. Microscopia óptica do subcutâneo de cobaia do grupo D (veneno + secretoma). Observa-se infiltrado inflamatório intenso apontado pelas setas brancas (HE, 40x).

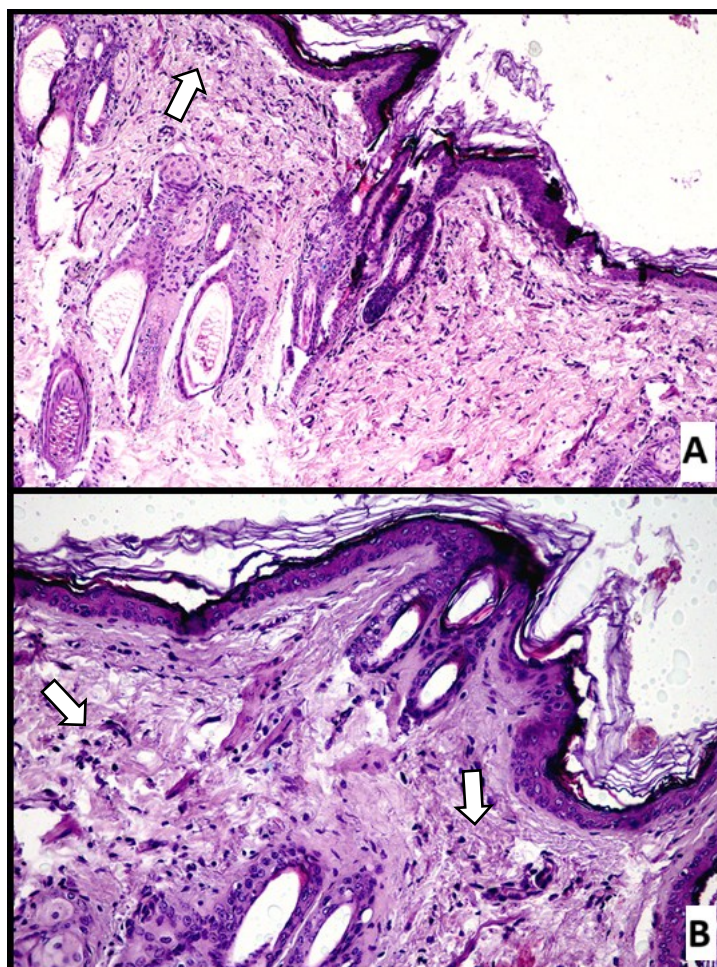


Figura 79. Microscopia óptica da pele de cobaia do grupo E (veneno + soro). Observa-se infiltrado inflamatório discreto apontado pelas setas brancas em A (HE, 10x) e B (HE, 20x).

Park et al. (2018) identificaram cascatas sinalizadas pelo secretoma de TA humano na modulação de cicatrização *in vitro*, com efeitos benéficos no tecido avaliado. Experimento *in vivo* realizado com o meio condicionado de CT derivadas de TA num modelo de camundongos diabéticos mostrou cicatrização acelerada e aumento de angiogênese em úlceras, além de reduzir polineuropatia (De Gregorio et al., 2020); foi observada melhor cicatrização com uso de CT derivadas de líquido amniótico humano no tratamento de lesões por queimadura em camundongos (J.-Y. Li et al., 2019); He et al. (2019) utilizando secretoma proveniente de Adip-CTM identificaram redução da área de feridas, angiogênese e boa cicatrização em camundongos com lesões incisionais. Ensaio clínico em patologias neurológicas também demonstram um campo promissor para o uso do secretoma (Ghasemi et al., 2023).

Martins et al. (2022) fizeram uso experimental de dapsona, CT mesenquimais e dapsona associada às CTM para tratamento de necrose induzida pelo veneno de *L. laeta* em coelhos Nova Zelândia. Os indivíduos submetidos ao tratamento com dapsona ou CTM isoladamente

apresentaram lesões menores e com melhor cicatrização. Já os indivíduos tratados com dapsona associada às CTM, além de boa cicatrização, também apresentaram maior deposição de fibras colágenas. Entretanto, são necessários mais estudos para avaliar os efeitos benéficos dessa terapia. É importante salientar que foram utilizadas CTM e não seu subproduto, o que pode gerar a diferença nos resultados.

Rodrigues et al. (2024), ao utilizarem secretoma de Adip-CTM humanas, inocularam 10µg de veneno de *L. intermedia* por via ID em coelhos. Um grupo foi tratado com solução salina, outro foi tratado com 60µg de secretoma por via ID e um terceiro grupo foi tratado com 60 µg de secretoma por via IV. Havia também um grupo controle, desafiado com soro e tratado com 60µg de secretoma ID. Os indivíduos envenenados e tratados com secretoma ID apresentaram lesões histopatológicas compatíveis com infiltrado inflamatório, necrose e angiogênese. Os animais tratados com secretoma IV apresentaram, além das alterações citadas nos tratados com secretoma ID, tecido de granulação, sugerindo melhor cicatrização. A divergência de resultados em comparação ao presente estudo pode ter relação com a dose de secretoma utilizada, que foi superior nas cobaias, o que pode ter favorecido a inflamação ao invés de reduzi-la.

Robert et al. (2019), ao usarem o meio condicionado de células estromais multipotentes na cicatrização de feridas em camundongos, observaram lesões semelhantes entre os animais controle e os animais tratados, sem redução do tamanho da ferida ou ausência de células inflamatórias. Contudo, o grupo tratado apresentou angiogênese mais intensa, que pode ser favorável no processo de reparação tecidual.

É relevante salientar que fatores como a espécie, o tipo de lesão tecidual e sua causa, a composição do secretoma, bem como sua dose e via de aplicação, podem levar a resultados variáveis no reparo de feridas.

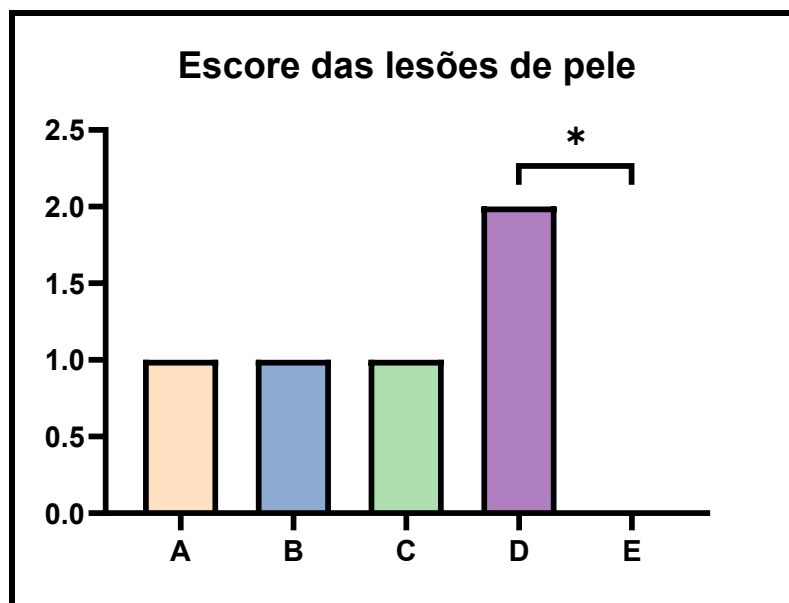


Figura 80. Representação gráfica do escore atribuído às lesões histopatológicas da pele nos diferentes grupos experimentais. Observa-se a comparação do escore entre os grupos. \* $p < 0,05$ .

#### 5.4.2. Coração

Como parte do objetivo do trabalho foi estudar os possíveis efeitos cardiotoxicos do veneno loxoscélico, a avaliação histopatológica deste órgão se faz muito importante nessa investigação.

Na avaliação macroscópica do coração, os animais saudáveis não apresentaram alterações. Os animais desafiados com veneno e tratados com salina 0,9% apresentaram coração hiperêmico, com aspecto mais globoso e hemorrágico. Um dos animais tinha efusão pericárdica no momento da necropsia, conforme se observa nas imagens abaixo (figuras 81 e 82).

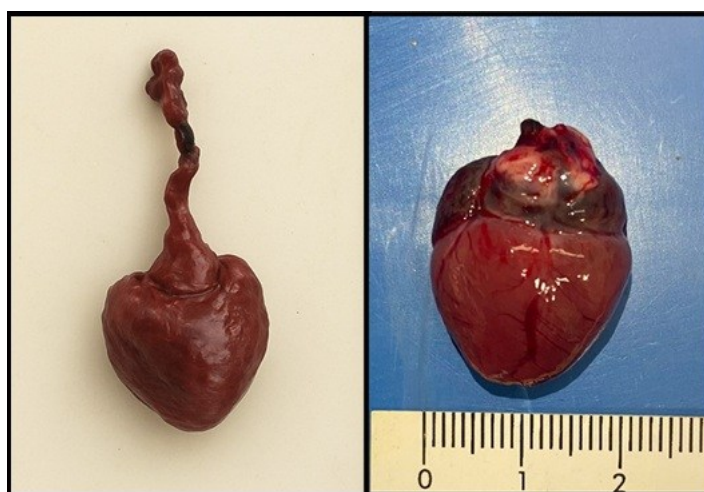


Figura 81. Comparação do aspecto macroscópico do coração de cobra saudável (à esquerda) e de cobra do grupo B (à direita). Observa-se que o coração do animal envenenado apresenta formato globoso em relação ao coração saudável e possui aspecto hemorrágico.



Figura 82. Coração de cobaia do grupo B (veneno + salina 0,9%) no momento da necropsia. Observa-se efusão pericárdica translúcida e em quantidade discreta.

Os indivíduos do grupo salina 0,9% + secretoma e veneno + secretoma apresentaram o coração hiperêmico e com aspecto hemorrágico, conforme é possível ver abaixo (figuras 83 e 84).

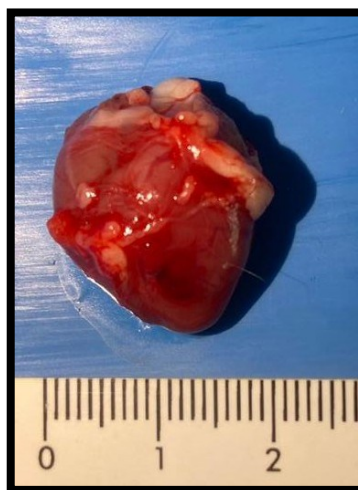


Figura 83. Coração de cobaia do grupo C (salina 0,9% + secretoma) com aspecto hemorrágico.

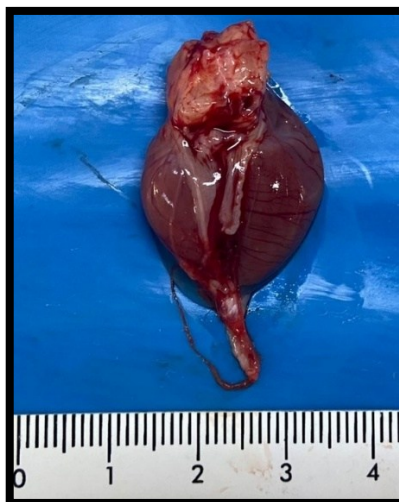


Figura 84. Coração de cobaia do grupo D (veneno + secretoma). Observa-se hiperemia.

Os animais do grupo veneno + soro antiloxoscélico (grupo E) não apresentaram alterações macroscópicas relevantes.

Em relação à avaliação microscópica, os animais saudáveis, conforme esperado, não apresentaram alterações histológicas dignas de nota (Figura 85).

No grupo B, foram observadas lesões discretas e lesões moderadas. Foram identificados infiltrados linfo-plasmocitários e linfo-histioplasmocitários no miocárdio e endocárdio. Em alguns infiltrados, havia presença de ocasionais HET. Vacuolização de cardiomiócitos e coágulos com grande quantidade de HET também foram observados. Nas figuras 86, 87 e 88, é possível visualizar as lesões citadas.

O grupo C também apresentou lesões histológicas, o que pode significar sua interferência no tecido cardíaco. Entretanto, foram lesões discretas. Foram observados infiltrados linfo-plasmocitários com raros HET, infiltrado linfocitário, presença de vacuolização de cardiomiócitos. Também foi visto um coágulo com HET no entorno. Foram identificadas alterações no tecido atrial e ventricular (figura 89).

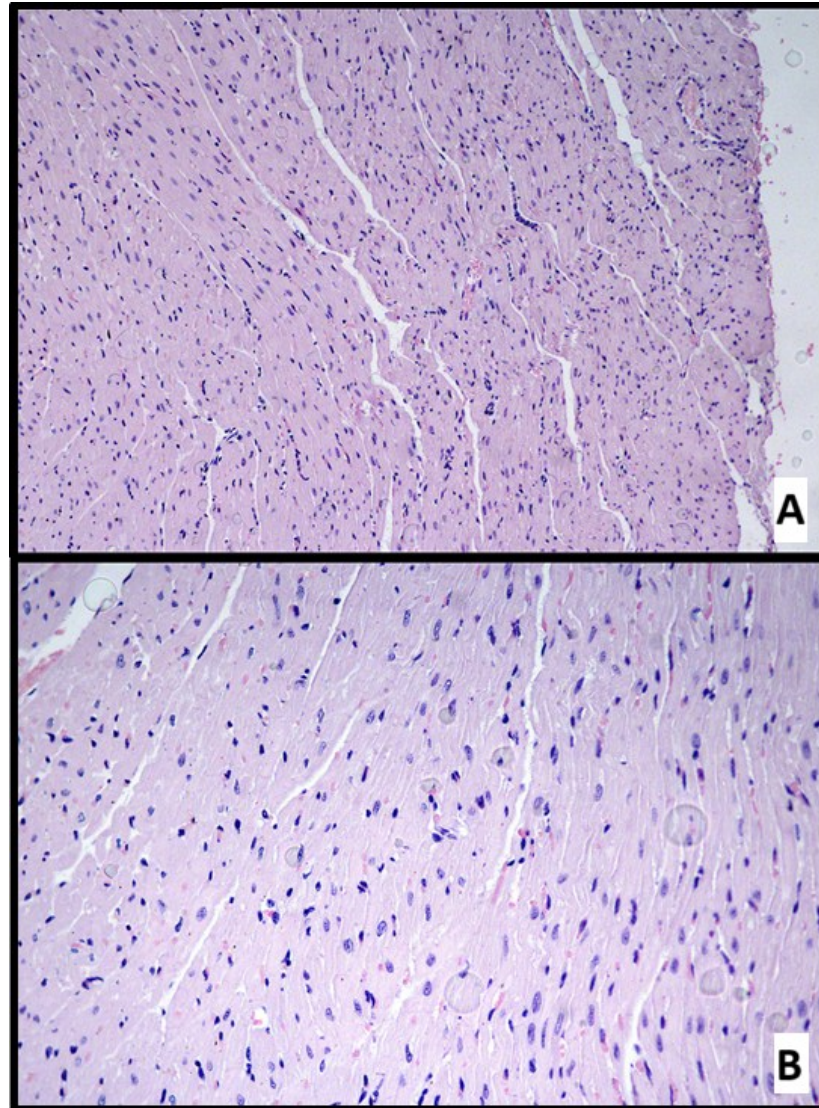


Figura 85. Microscopia óptica do coração de cobaia hígida. Tecido cardíaco normal em A (HE, 10x) e B (HE, 20x).

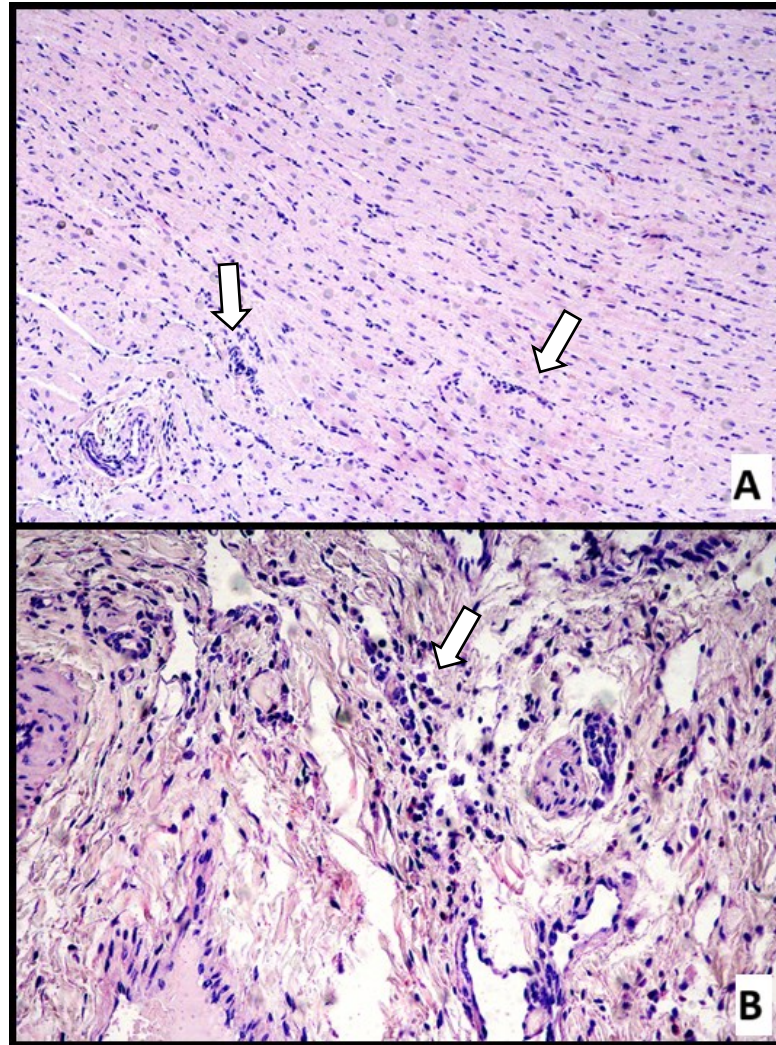


Figura 86. Microscopia óptica do coração de cobaia do B (veneno + salina 0,9%). Corte histológico do miocárdio evidenciando infiltração inflamatória apontada pelas setas brancas em A (HE, 10x) e B (HE, 20x).

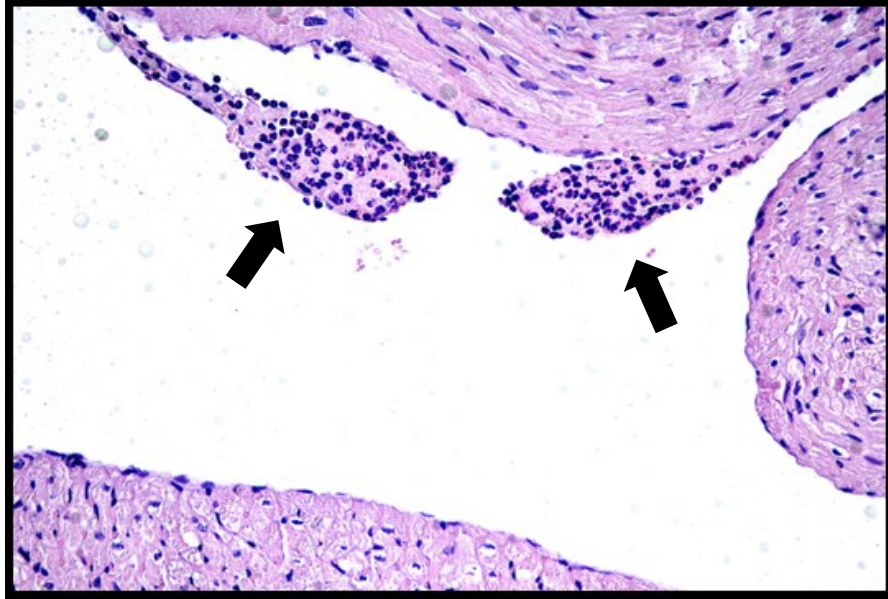


Figura 87. Microscopia óptica evidenciando a presença de um coágulo circundado por HET (apontado por setas pretas) num animal do grupo B (veneno + salina 0,9%) (HE, 20x).

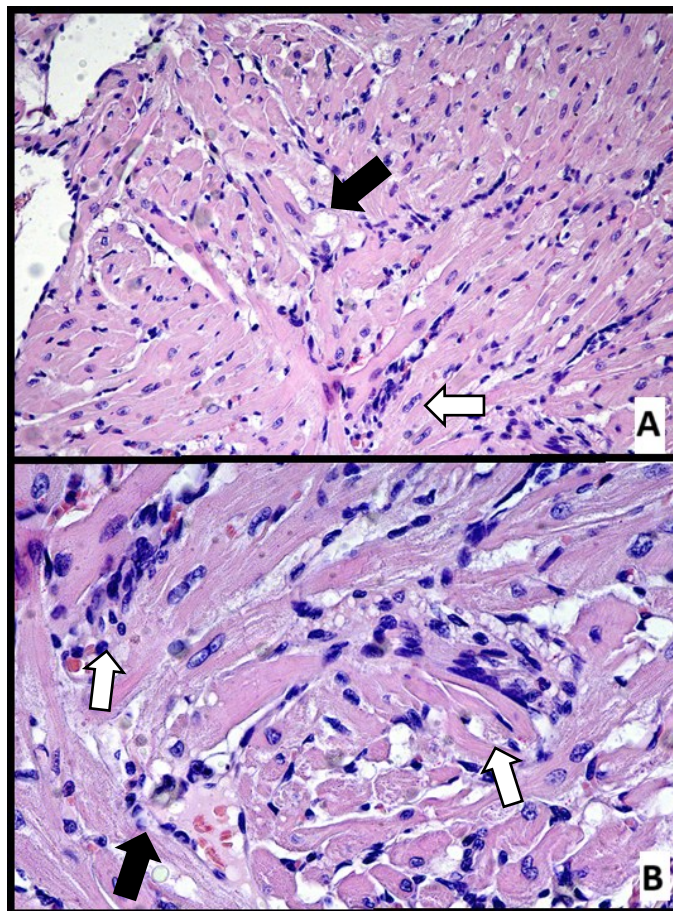


Figura 88. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo B (veneno + salina 0,9%). Observa-se infiltração inflamatória (setas brancas) e vacúolos citoplasmáticos (seta preta) em A (HE, 10x) e B (HE, 20x).

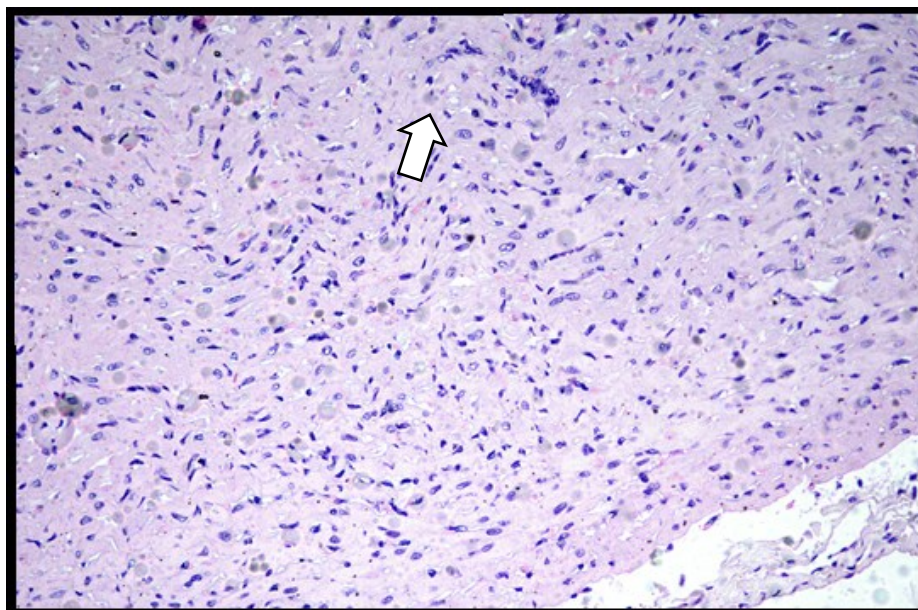


Figura 89. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo C (salina 0,9% + secretoma). Observa-se infiltrado inflamatório discreto, apontado pela seta branca (HE, 10x).

O grupo D apresentou alterações discretas na histologia cardíaca. Foram observados infiltrados linfo-histioplasmocitário e linfoplasmocitário no miocárdio e no endocárdio, predominantemente perivasculares, além de infiltração focal de HET. Observou-se vacuolização discreta de cardiomiócitos e presença de coágulos circundados por HET, em baixa quantidade. Observam-se imagens histológicas na figura 90.

As lesões identificadas no grupo E foram discretas, distribuídas de forma semelhante ao descrito nos demais grupos, presentes nos átrios, ventrículos, endocárdio e miocárdio. Havia infiltração inflamatória discreta, tanto linfo-plasmocitária como linfo-histio-plasmocitária, com predominância perivascular. Foram observados coágulos com grande quantidade de HET. Não foi registrada vacuolização de cardiomiócitos. Observam-se imagens histológicas na figura 91.

Considerando o escore de graduação das lesões, foi efetuada a comparação entre os grupos (Figura 92). O grupo B teve maior escore de lesões. O grupo D e o grupo E apresentaram classificação igual. O grupo que recebeu apenas secretoma teve o escore mais baixo, desconsiderando o grupo A, que não teve lesões e ficou com escore zero. Foi observada diferença significativa entre os grupos B e C. É interessante observar que não houve diferença entre os demais tratamentos. Dessa forma, pode-se inferir que, embora com lesões menos graves, os grupos veneno + secretoma (grupo D) e veneno + soro antiloxoscélico (grupo E) não tiveram um benefício explícito, significativo estatisticamente, dos tratamentos nesse aspecto. Entretanto, ainda assim apresentaram escore inferior ao do grupo B. Contudo, mesmo não

havendo relevância estatística, a diferença é relevante para um indivíduo, que pode ter lesões menos graves quando tratado.

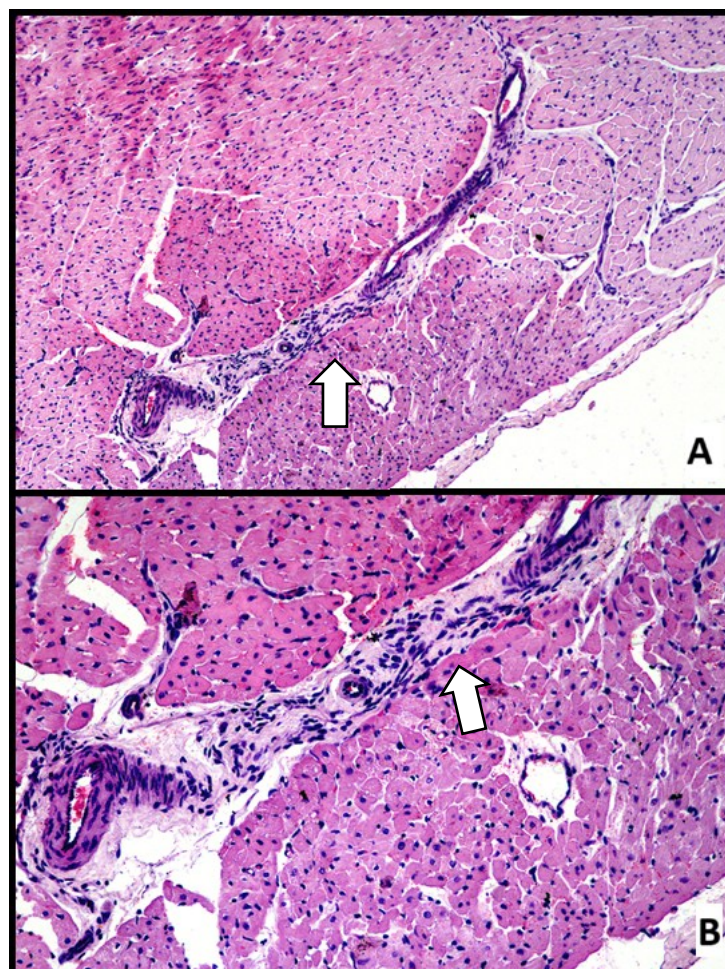


Figura 90. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo D (veneno + secretoma). Miocárdio evidenciando infiltrado inflamatório perivascular (setas brancas) em A (HE, 10x) e B (HE, 20x).

As informações sobre achados histopatológicos no coração relacionados ao envenenamento loxoscélico são muito escassas na literatura. Há relatos de casos em pacientes humanos que apresentaram alterações cardíacas após a picada de uma aranha do gênero *Loxosceles* spp: um caso de miocardite diagnosticado por ressonância magnética (Langner et al., 2021) e um caso de Síndrome de Kounis, que é uma síndrome coronariana aguda secundária a uma reação anafilática. No caso específico, a reação anafilática foi ao veneno loxoscélico (Navarro-Martinez et al., 2022).

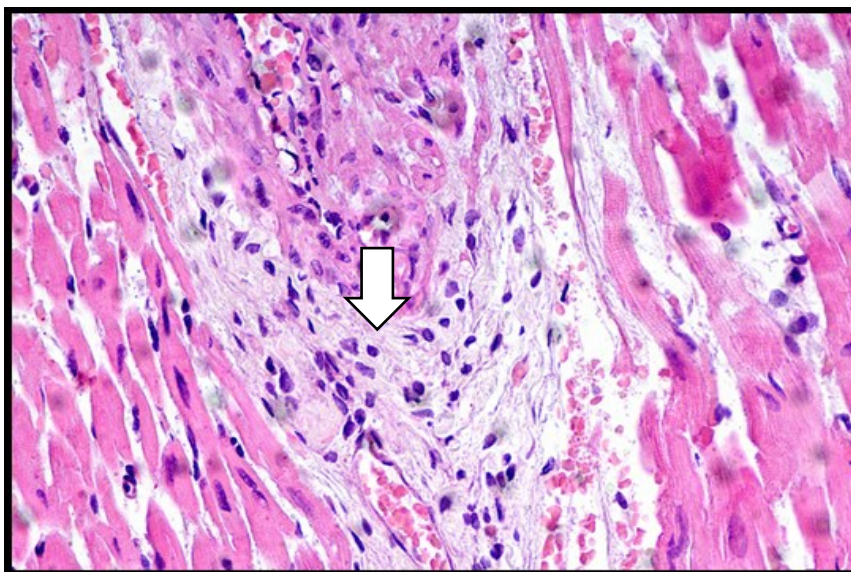


Figura 91. Microscopia óptica do coração de cobaia do grupo E (veneno + soro). Observa-se infiltrado inflamatório no miocárdio, predominantemente perivascular, apontado pela seta branca (HE, 40x).

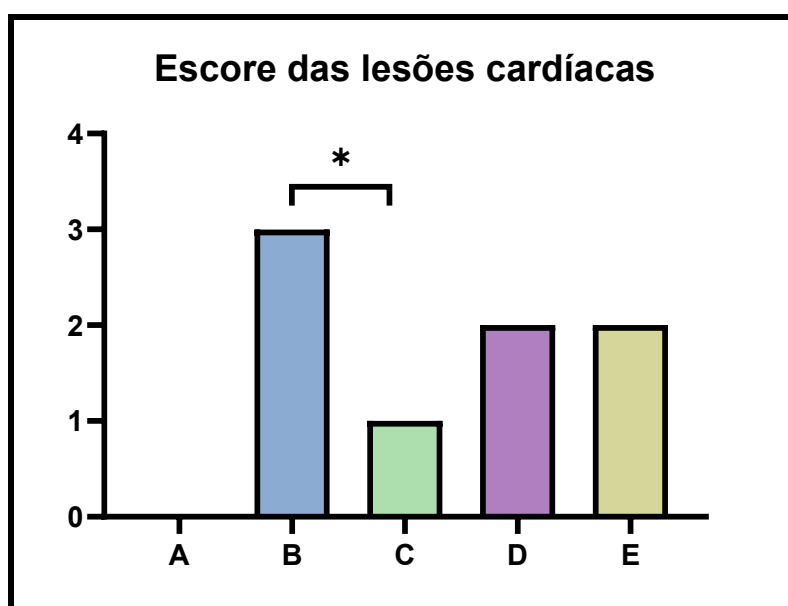


Figura 92. Representação gráfica do escore atribuído às lesões histopatológicas do coração nos diferentes grupos experimentais. Observa-se a comparação do escore entre os grupos. \* $p < 0,05$ .

Embora não tenha sido demonstrada ligação do veneno no coração das cobaias, foram identificadas lesões histológicas nos animais envenenados. O trabalho já citado de Fernandes (2024), que avaliou os efeitos de diferentes doses do veneno loxoscélico em cobaias, encontrou alterações histológicas nos indivíduos que receberam 24 $\mu$ g e 210 $\mu$ g, respectivamente. Foi observada congestão cardíaca difusa acentuada no animal inoculado com a menor dose e

hemorragia focalmente extensa moderada no AE da cobaia inoculada com maior dose. Pondera-se que as variações de dose podem interferir nos achados. Ainda, a suscetibilidade individual parece um fator importante, uma vez que não foram identificadas alterações cardíacas em outros animais do estudo de Fernandes. O secretoma isoladamente também ocasionou danos às células cardíacas, embora em menor intensidade, mas sua aplicação levou à presença de infiltrados inflamatórios no miocárdio e à presença de trombos. O soro antiloxoscélico preveniu lesões mais graves nos indivíduos que o receberam, mas não impediu totalmente danos ao miocárdio.

Como o envenenamento loxoscélico ocasiona aumento das contagens de LEU, por maior mobilização e migração (Nguyen & Pandey, 2019), tal efeito favorece a presença de células inflamatórias como resposta ao veneno no tecido cardíaco. Não obstante, os distúrbios hematológicos reduzem a quantidade de PLT, favorecendo a formação de coágulos (Kodali et al., 2014). Os coágulos podem comprometer a irrigação miocárdica, mesmo que de forma transitória, e isso pode levar a danos no miocárdio. Não foram identificadas áreas de necrose nos animais do estudo, porém, a hipóxia pode não ser tão intensa e pode ser proporcional à dose de veneno aplicada. Fatores como espécie, idade do animal e variação individual também devem ser levados em consideração.

O secretoma tem sido muito estudado e testado no tratamento de doenças cardíacas. Há pouca informação sobre seus efeitos num coração saudável, pois a maioria dos estudos busca avaliar suas ações em quadros patológicos. Experimentalmente, demonstrou-se que o coração explantado de ratos secreta substâncias capazes de reduzir a concentração de peptídeos natriuréticos e fatores que favorecem a sobrevivência e multiplicação de fibroblastos, melhorando a cicatrização. Além disso, o secretoma reprograma células imunes a favor do reparo do tecido cardíaco. O conhecimento do que é secretado, de receptores e fatores ligantes pode promover avanços na terapia cardíaca (Lindsey & Gundry, 2020). Observações *in vivo* em modelo experimental de ratos infartados mostraram parâmetros ecocardiográficos melhores nos animais tratados com secretoma (Guan et al., 2025b). Um estudo clínico em fase 1 avaliou a aplicação de secretoma em pacientes humanos com insuficiência cardíaca. Foi observada boa tolerância à aplicação IV, assim como melhora dos parâmetros ecocardiográficos (Menasché et al., 2024). As pesquisas são promissoras e mostram resultados bons em sua maioria. Tais propriedades do secretoma podem ter tido efeitos benéficos nos animais do grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma, que tiveram lesões similares aos tratados com o soro, que é o padrão-ouro, e menos lesões do que os animais do controle positivo. Entretanto, o grupo que recebeu apenas o secretoma também teve lesões cardíacas discretas, o que pode significar que, em um

tecido saudável, sua ação pode favorecer processos inflamatórios, mesmo que de baixa intensidade.

### 5.5. Contratilidade cardíaca e *patch clamp*

Com relação à contratilidade cardíaca, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo para o relaxamento e tempo para o relaxamento 50%; amplitude do pico, que representa o menor comprimento do sarcômero; fração de encurtamento; relaxamento cardíaco; tempo para o pico, que corresponde ao tempo necessário para se atingir o menor comprimento do sarcômero; tempo para contração e tempo para contração 50%. Já na avaliação do PA, foram estudados os seguintes parâmetros: potencial de repouso, amplitude do PA, duração do PA a 10% e duração do PA a 50%. Os resultados serão discutidos em conjunto.

Nas figuras 93, 94, 95, 96 e 97 estão demonstrados os resultados da avaliação da contratilidade cardíaca e o perfil da contração em cada um dos grupos.

Os achados da contratilidade e do PA foram registrados no tempo 7 dias e os achados da histopatologia, obtidos após a eutanásia, no tempo 14 dias. Ainda que essas análises não tenham avaliado os efeitos agudos do envenenamento, avaliaram os seus efeitos no coração num período maior. A presença de lesões cardíacas histológicas e as alterações na contração, relaxamento e PA auxiliam a explicar a ocorrência dos efeitos identificados *in vivo*. A presença de arritmias até o tempo 14 dias sugere que as lesões e modificações na função exerceram efeitos a longo prazo. Além disso, as alterações hematológicas, como anemia no grupo D e trombocitopenia nos animais envenenados e tratados com salina 0,9%, corroboram seus efeitos deletérios na atividade cardíaca.

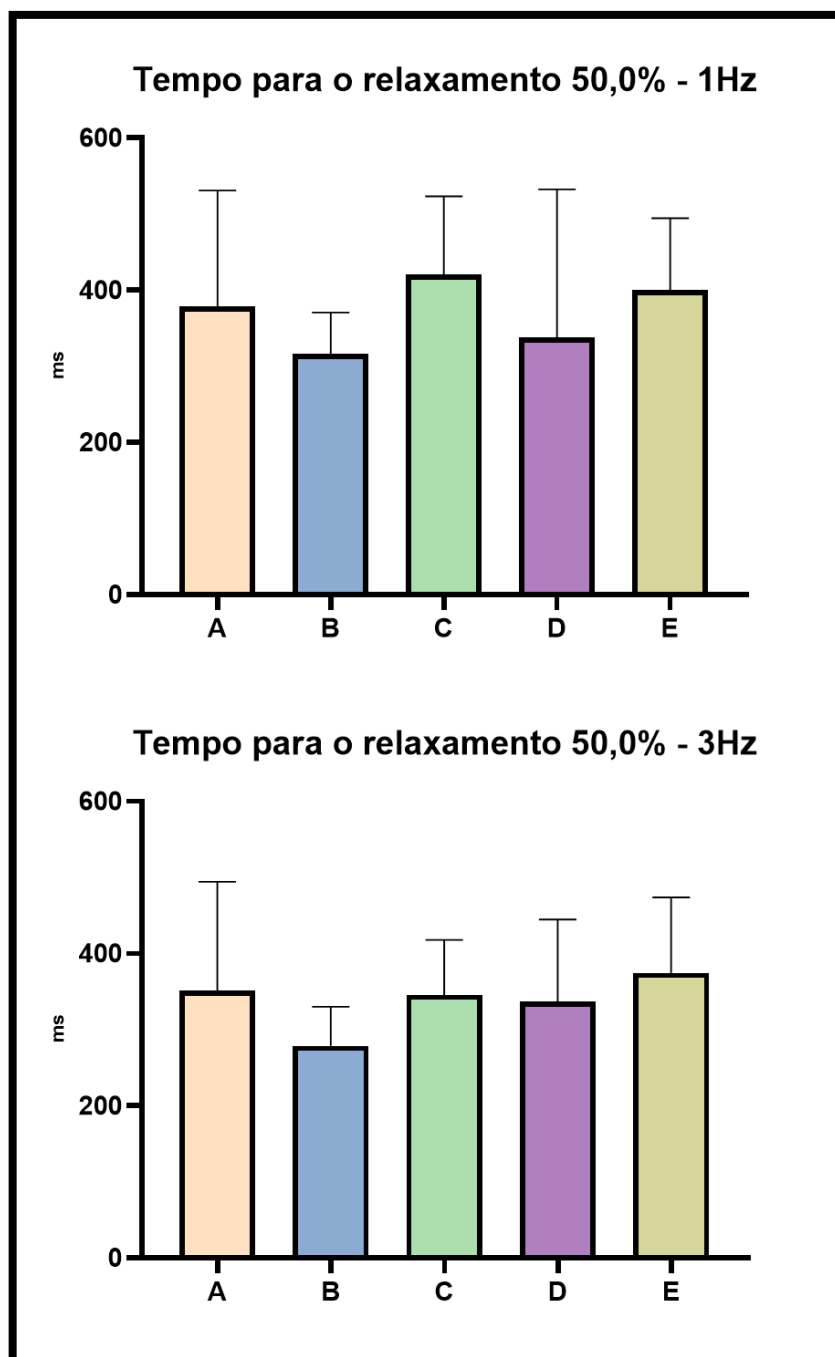


Figura 93. Média e o desvio-padrão do tempo para o relaxamento 50% nos diferentes grupos experimentais. A: animais saudáveis; B: grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%; C: grupo desafiado com secretoma e tratado com salina 0,9%; D: grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma; E: grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxoscélico.

Como é possível observar na imagem acima, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos em relação ao tempo para o relaxamento 50%. Contudo, quando avaliado em sua totalidade, o relaxamento diferiu entre os grupos. Com o estímulo de 1Hz,

houve diferença significativa entre os grupos. Percebe-se que o grupo C apresentou o relaxamento mais lento em relação aos demais (figura 94).

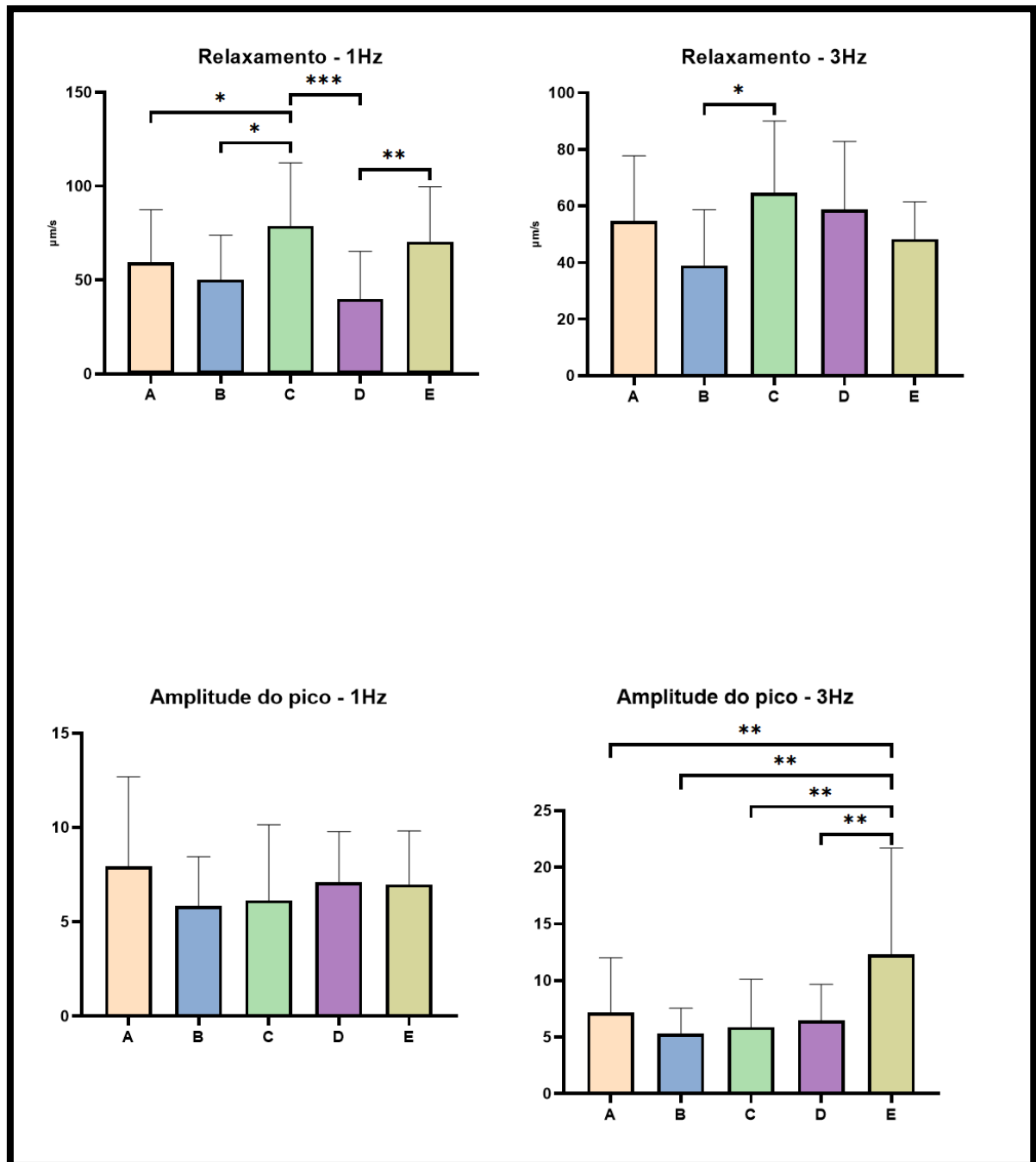


Figura 94. Média e desvio-padrão do relaxamento (1Hz e 3Hz) e da amplitude do pico (1Hz e 3Hz) nos diferentes grupos experimentais. A: animais saudáveis; B: grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%; C: grupo desafiado com secretoma e tratado com salina 0,9%; D: grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma; E: grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxoscélico.  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,003$ .

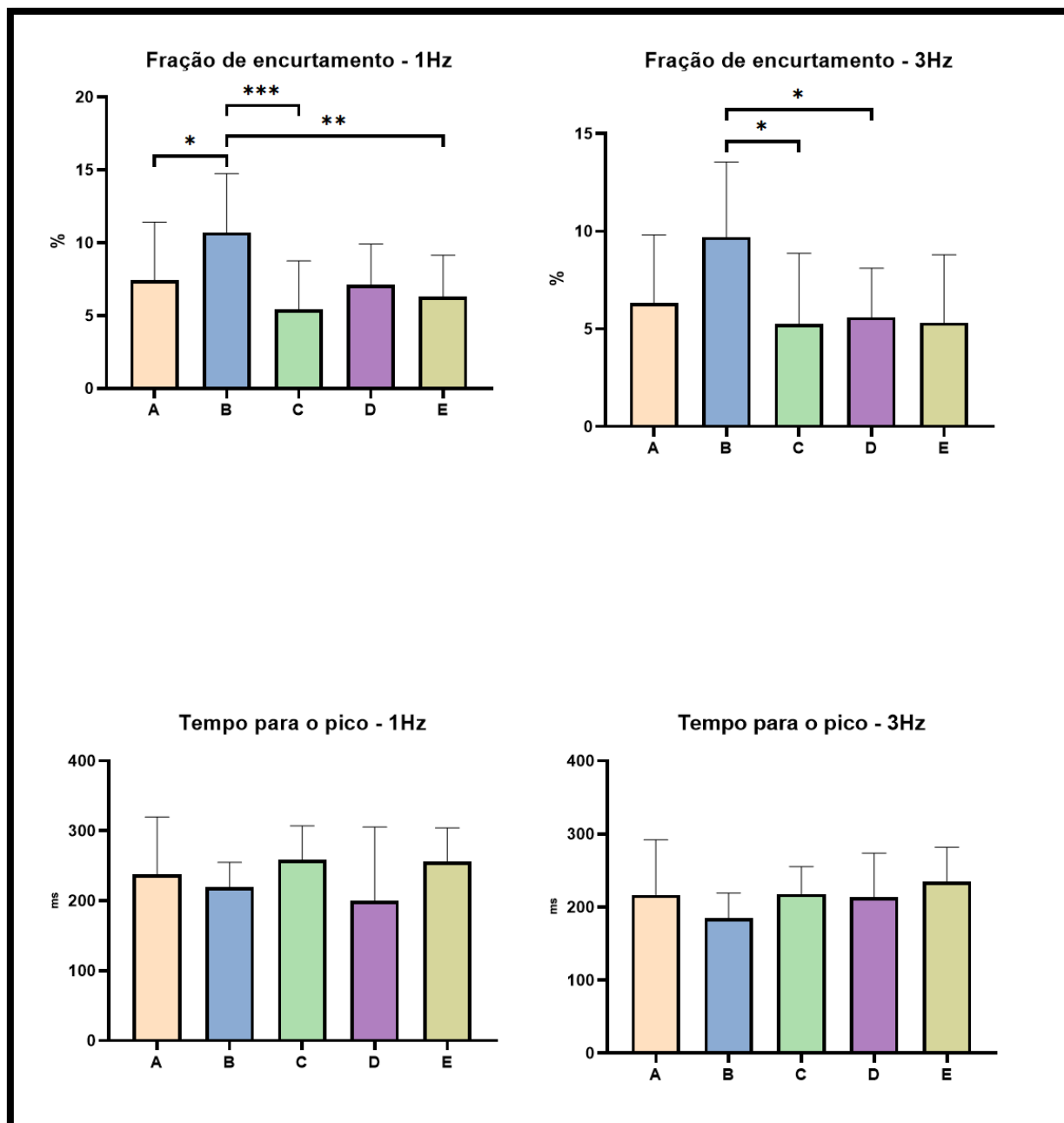


Figura 95. Média e desvio-padrão da fração de encurtamento (1Hz e 3Hz) e do tempo para o pico (1Hz e 3Hz) nos diferentes grupos experimentais. A: animais saudáveis; B: grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%; C: grupo desafiado com secretoma e tratado com salina 0,9%; D: grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma; E: grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxoscélico.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,003$ .

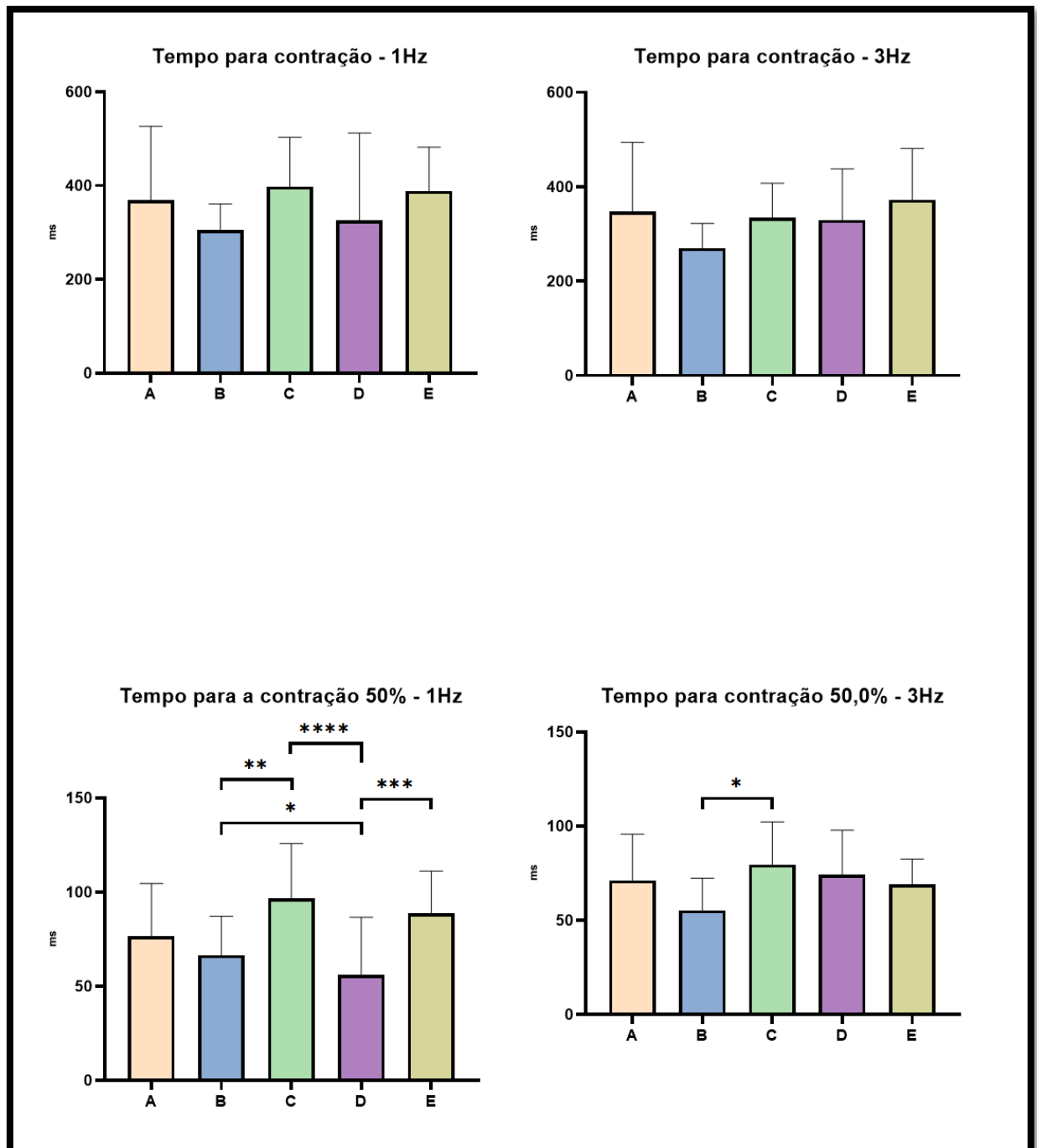


Figura 96. Média e desvio-padrão do tempo para contração (1Hz e 3Hz) e do tempo para a contração 50% (1Hz e 3Hz) nos diferentes grupos experimentais. A: animais saudáveis; B: grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%; C: grupo desafiado com secretoma e tratado com salina 0,9%; D: grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma; E: grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxoscélico.  
 \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,003$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ .

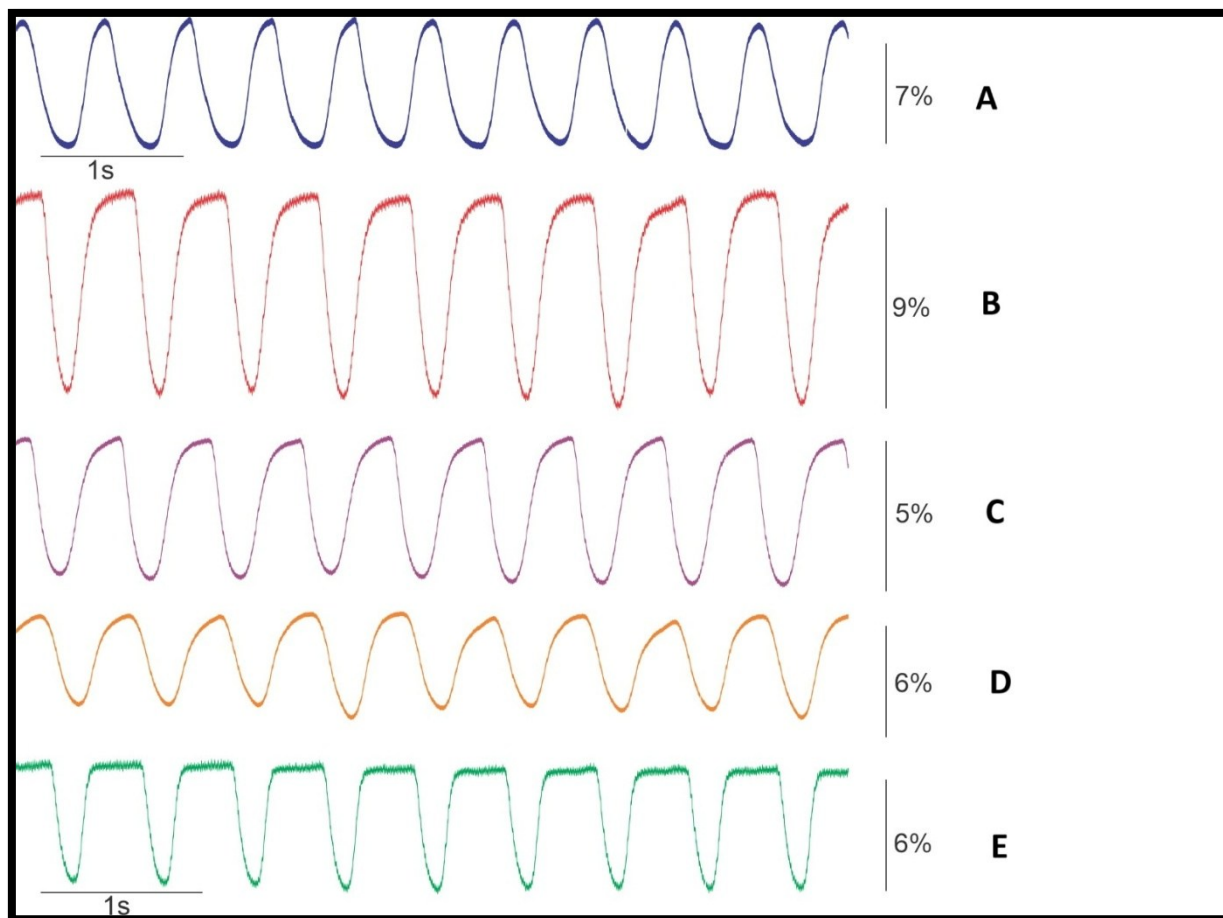


Figura 97. Perfil da contratilidade em cada grupo experimental. A: animais saudáveis; B: grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%; C: grupo desafiado com secretoma e tratado com salina 0,9%; D: grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma; E: grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxoscélico.

Quando realizado o estímulo de 3Hz, foi observada diferença entre o grupo B e o grupo C, que manteve seu relaxamento mais lento (figura 94).

Com o estímulo de 1Hz, não houve diferença entre os grupos na amplitude do pico. Já com 3Hz, o grupo E apresentou uma amplitude do pico significativamente maior que os demais grupos (figura 94).

A fração de encurtamento apresentou diferenças nas duas frequências de estímulo. Na avaliação a 1Hz, o grupo B teve fração de encurtamento superior à dos grupos A, D e E. Na avaliação a 3Hz, o grupo B teve fração de encurtamento maior em comparação aos grupos C e D (figura 95).

Não foram observadas diferenças entre os grupos, na frequência de 1Hz ou de 3Hz, em relação ao tempo para o pico ou tempo para a contração (figuras 95 e 96).

Por último, foram observadas diferenças no tempo para contração a 50%. Com o estímulo de 1Hz, o grupo B teve um valor superior ao grupo C e ao grupo D. O grupo D apresentou um tempo para contração a 50% significativamente menor do que o grupo E. O grupo C apresentou um tempo para a contração a 50% superior ao grupo D. No estímulo de 3 Hz, o grupo C continuou a apresentar valor superior aos animais envenenados e tratados com salina 0,9% (figura 96).

Na imagem abaixo, observa-se o comportamento do PA de cada grupo. As figuras 98 e 99 demonstram as comparações dos parâmetros do PA entre os grupos.

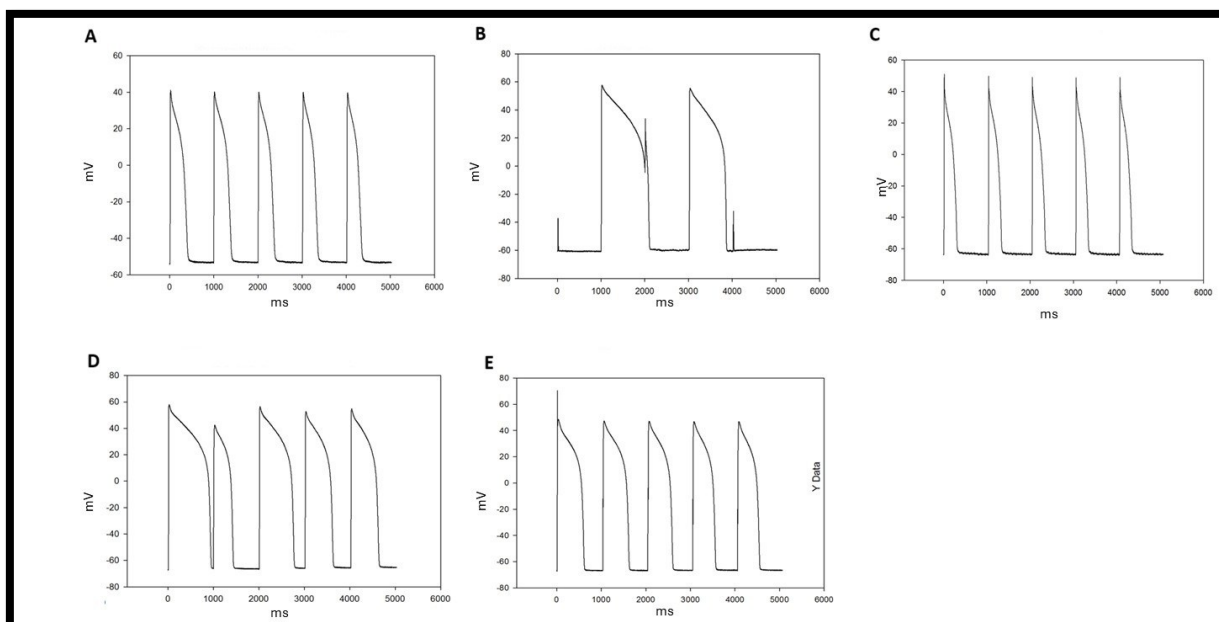


Figura 98. Comportamento do potencial de ação de cada grupo experimental. A: animais saudáveis; B: grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%; C: grupo desafiado com secretoma e tratado com salina 0,9%; D: grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma; E: grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxoscélico.

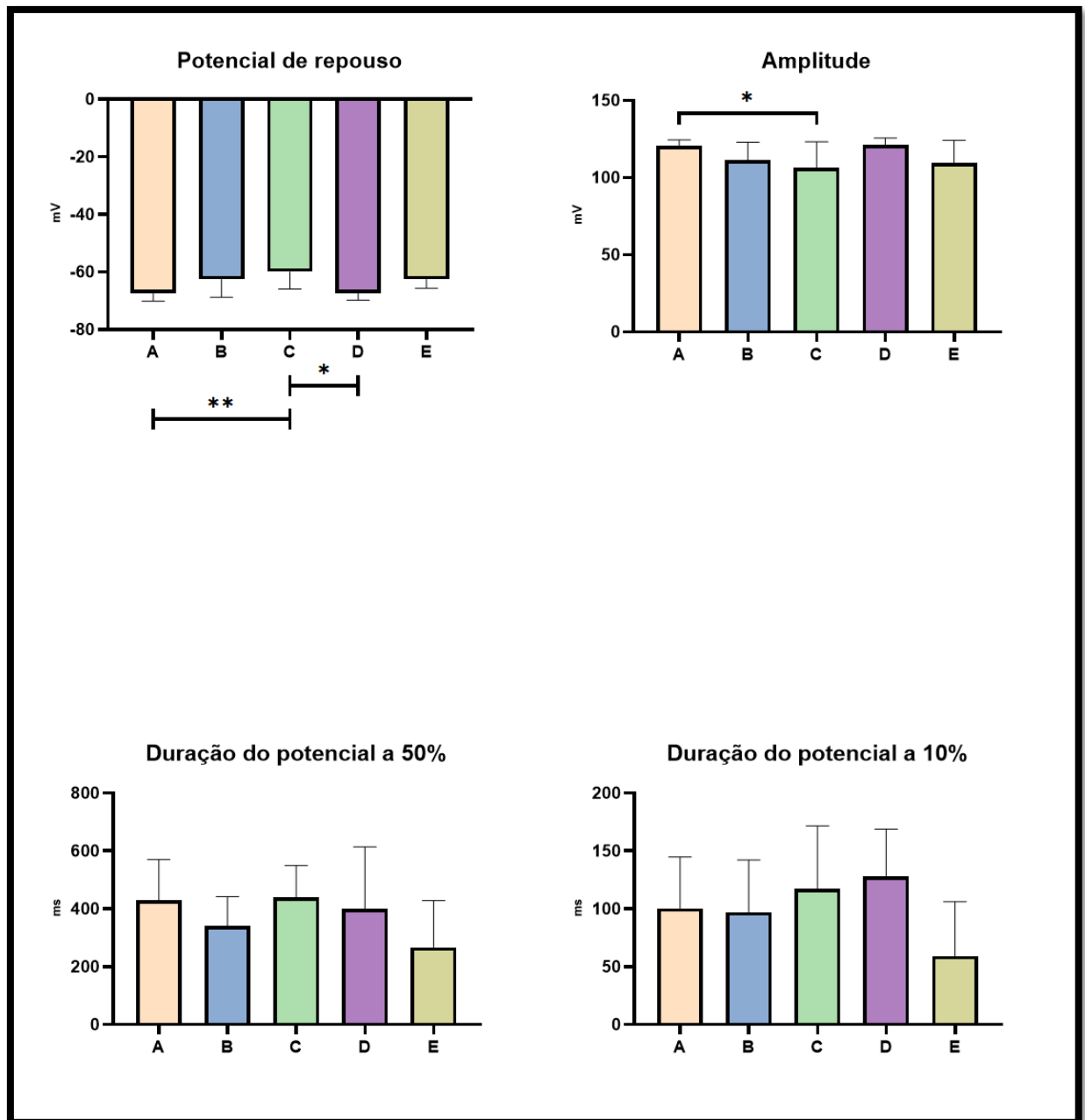


Figura 99. Média e desvio-padrão do potencial de repouso, da amplitude do pico, da duração do potencial a 50% e duração do potencial a 10% nos diferentes grupos experimentais. A: animais saudáveis; B: grupo desafiado com veneno e tratado com salina 0,9%; C: grupo desafiado com secretoma e tratado com salina 0,9%; D: grupo desafiado com veneno e tratado com secretoma; E: grupo desafiado com veneno e tratado com soro antiloxscélico. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ .

Foram observadas diferenças significativas no potencial de repouso e na amplitude do PA. O potencial de repouso foi significativamente maior no grupo D em relação ao grupo C. Ainda, o grupo desafiado com salina 0,9% e tratado com secretoma apresentou potencial de repouso inferior ao dos animais saudáveis. No que diz respeito à amplitude, a do grupo C foi inferior à do grupo A (figura 99).

Com base nas avaliações realizadas, fica ressaltada a influência do veneno na fração de encurtamento, que foi superior à dos demais grupos, o que também afetou o tempo para a contração a 50%. Enfatizam-se os efeitos do secretoma, que levou a um relaxamento mais lento em relação aos outros grupos, e do veneno, que levou a uma contração mais rápida que a dos demais grupos.

Dias-Lopes et al. (2010) inocularam 2,5 $\mu$ g de veneno por via subcutânea em camundongos. Os pesquisadores observaram presença do veneno no coração por meio de pesquisa de antígeno com ELISA e redução da função cardíaca na perfusão de coração inteiro isolado. Foi identificado aumento da densidade da corrente de cálcio ( $I_{Ca, L}$ ) e elevação do transiente de  $Ca^{2+}$  intracelular. A ligação de uma proteína recombinante do veneno foi demonstrada por imunofluorescência e microscopia confocal. Tais achados são muito importantes na compreensão de que o veneno chega até o coração, pode se ligar ao tecido cardíaco e interferir na sua atividade elétrica, impactando na função mecânica. Contudo, a espécie e a dose diferem da utilizada no presente estudo.

Ernault et al. (2022) avaliaram os efeitos do uso do secretoma de tecido adiposo epicárdico e de tecido adiposo subcutâneo extraído de pacientes humanos com fibrilação atrial. Ambos os secretomas foram incubados por 72h em células de cultivo de miocárdio ventricular de ratos neonatos. Para efeitos de comparação, essas células de cultivo foram incubadas pelo mesmo período com o meio condicionado dos próprios cardiomiócitos dos ratos neonatos. Como resultados, observaram que o secretoma de adipócitos de epicárdio teve um efeito deletério, reduzindo a velocidade de condução do impulso elétrico, a velocidade máxima do *upstroke* do PA e potencial de repouso do PA menos negativo, favorecendo a formação de arritmias. Os mesmos efeitos não foram observados com secretoma de tecido adiposo subcutâneo. Ten Sande et al. (2017) encontraram resultados semelhantes ao incubar cardiomiócitos de ratos neonatos com secretoma proveniente de tecido adiposo de ratos, suínos e humanos. Os autores mensuraram a velocidade de condução com microeletrodos. Houve redução da velocidade de condução com o secretoma das três espécies. Tais achados podem justificar alterações de condução induzidas pelo secretoma, o que pode ter interferido no ECG

dos animais. De qualquer maneira, é importante evidenciar que os estudos citados foram realizados *in vitro*, e não terão necessariamente a mesma correlação em modelos *in vivo*. Trabalhos realizados com aplicação de secretoma proveniente de tecido adiposo em seres humanos, como o estudo ATHENA (Henry et al., 2017), que mostra resultados favoráveis ao seu uso em pacientes com doença coronariana crônica. Entretanto, a via de administração utilizada foi injeções de infiltração miocárdica, diferindo do modelo utilizado no experimento realizado com as cobaias. Além disso, o uso do secretoma foi testado em condições diferentes: em doença coronariana crônica.

Os achados no PA cardíaco foram semelhantes aos descritos na literatura. Ao analisar o perfil de cada PA, percebe-se que o grupo C é o que se apresentou mais semelhante ao grupo A. Entretanto, seu potencial de repouso inferior demonstra que a célula cardíaca que o recebeu ficou mais despolarizada, favorecendo a ocorrência de arritmias por atividade deflagrada, conforme ficou evidenciado nos ECGs. Neste caso, há um aumento da automaticidade, favorecendo a ocorrência de mais PAs (Tse, 2016). Sua interação com o veneno resultou num potencial de repouso mais positivo e sem diferenças em relação aos animais saudáveis ou aos envenenados e tratados com salina 0,9%. Além disso, a sua menor amplitude em relação à dos animais saudáveis pode se dever ao fato de a célula partir de um valor mais positivo. Possíveis fatores que prolongariam o tempo de relaxamento, como observado nas análises da contratilidade, estão associados à taxa de declínio do transiente de cálcio, como: alterações no funcionamento da SERCA, aumento de correntes de sódio e uma proporção elevada de fosfolambano (Biesiadecki et al., 2014).

Embora o veneno de isoladamente não tenha afetado o PA, é perceptível na figura seu efeito na ocorrência de pós-despolarização precoce ou *early after depolarization* (EAD) e pós-despolarização retardada ou *delayed after depolarization* (DAD). Isso pode justificar o maior número de arritmias nos animais envenenados e tratados com salina 0,9%. A ocorrência de EAD se correlaciona à baixa reserva de repolarização, que pode se dever a um aumento nas correntes de entrada, principalmente sódio e cálcio (com destaque para os canais de cálcio do tipo L), ou redução nas correntes de saída, representadas pelo fluxo de potássio. Com isso, a célula se mantém mais positiva, há sobreposição da repolarização e um novo estímulo é deflagrado. Com predomínio de correntes de saída, a célula tende à repolarização após a EAD. Se há predomínio de correntes de entrada, a célula tende a não repolarizar e novos batimentos podem ocorrer (Weiss et al., 2010). As EADs também podem ser resultado de oscilações do ciclo do cálcio. Já as DADs se associam à liberação espontânea de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Song et

al., 2015). Os achados obtidos levam à hipótese de que o veneno pode interferir no balanço de cálcio, o que também interferiria na contratilidade, como foi observado. Contudo, não é possível descartar sua ação em canais de sódio ou potássio. Ainda, possíveis variações nos níveis séricos de eletrólitos, que não foram avaliados, podem interferir no funcionamento do PA e levar às observações relatadas.

No tempo 30 min, todos os indivíduos do grupo B apresentaram distúrbios de condução ou eventos arrítmicos. Nos tempos 48h e 72h, houve óbito de animais do grupo B, um indivíduo em cada um desses tempos. O desenvolvimento de arritmias graves é uma possibilidade para causa da morte.

Com base em Lazzerini et al. (2022), em revisão de literatura, há muitas evidências, baseadas em estudos experimentais e clínicos, demonstrando que a inflamação pode deflagrar diversos tipos de arritmias, principalmente pela liberação de citocinas. A atuação do veneno reduziu de significativamente a amplitude da onda P, da mesma maneira que o veneno associado ao secretoma. Além das razões citadas acima sobre possíveis efeitos do secretoma, é importante salientar que seu uso pode ter efeito pró-inflamatório (Munoz-Perez et al., 2021), o que pode afetar a função cardíaca. Além disso, as toxinas do veneno, direta ou indiretamente, também afetaram o sistema de condução cardíaco. Pode ter ocorrido ação direta de componentes do veneno no coração ou cardiotoxicidade por modificações hematológicas e formação de microtrombos, cuja presença foi identificada na histopatologia.

A redução da oxigenação ativa mecanismos compensatórios. Diminuição da pós-carga leva ao aumento da concentração de catecolaminas e outros fatores inotrópicos, contribuindo para aumento da FC, maior trabalho cardíaco e possível comprometimento da perfusão coronária (Metivier et al., 2000). As variações na FC e demais fatores mencionados podem interferir na atividade elétrica do coração, modificando a duração de seus intervalos e aumentando o risco de arritmias.

Ainda citando Ernault et al. (2022), os pesquisadores identificaram redução da atividade da corrente retificadora de potássio, que atua na fase inicial da repolarização, o que influenciou no formato e duração do PA, e deixou a célula mais despolarizada. Tal resultado pode justificar variações no intervalo QTc, uma vez que essa corrente é determinante na excitabilidade cardíaca e nessa etapa do PA. Contudo, espera-se prolongamento do intervalo QT com diminuição de atividade da corrente retificadora de potássio (Dhamoon & Jalife, 2005), o que não foi observado no experimento com as cobaias. Lin et al. (2012) também registraram redução da

atividade da corrente retificadora de potássio em miócitos de átrio esquerdo de coelhos incubados com tecido adiposo do epicárdio desses animais, além de maior atividade nas correntes de sódio, de canais de cálcio tipo L e corrente transiente de potássio. Contudo, mais uma vez, é importante lembrar que a avaliação com as cobaias foi *in vivo*, interferindo nos resultados obtidos e pode variar ou diferir em relação a estudos *in vitro*.

Conforme já mencionado, Ten Sande et al. (2017), ao analisar as diferenças entre cardiomiócitos de ratos neonatos em co-cultura com meio condicionado de células estromais derivadas do tecido adiposo de humanos, suínos e ratos, separadamente, encontraram redução de velocidade e aumento de heterogeneidade de condução com secretoma das três espécies. A cultura dos cardiomiócitos com o meio condicionado obtido das co-culturas só apresentou os mesmos resultados com o material proveniente de suínos. Ainda, foi realizada cultura *trans-well*, impedindo o contato entre os cardiomiócitos de ratos neonatos e o meio condicionado da cocultura com secretoma suíno, na qual houve redução da velocidade e aumento de heterogeneidade de condução, mas em menor magnitude quando comparado à co-cultura. Sendo assim, os pesquisadores ponderam que existem efeitos parácrinos de fatores solúveis produzidos pelo secretoma, mas que o contato entre as células amplifica esses efeitos. Pedrotty et al. (2009), Askar et al. (2013) e Cartledge et al. (2015) igualmente relataram a existência de efeitos parácrinos do secretoma do tecido adiposo ou de outros tipos celulares em células cardíacas. Askar et al. (2013) e Pedrotty et al. (2009) relataram as consequências na condução celular, tais como aumento na duração do PA, maior atividade deflagrada, arritmias e redução do potencial de repouso. Novamente, pondera-se que se trata de estudos *in vitro*.

Alterações cardíacas são reconhecidas em vários tipos de envenenamentos por animais peçonhentos. No escorpionismo, pode ocorrer cardiomiopatia e diversos tipos de arritmias, mediadas por ativação neuro-hormonal, liberação intensa de catecolaminas e estresse miocárdico (Navinan & Wijeyaratne, 2024). O veneno de serpentes de diferentes espécies e gêneros também possui potencial de levar a distúrbios cardiovasculares que podem culminar em arritmias. A hipotensão causada pelo veneno pode levar a danos cardíacos por redução da perfusão; há possibilidade de lesões cardíacas secundárias a coagulopatias; microangiopatias; trombos; anemia hemolítica; trombocitopenia; estado pró-inflamatório por hipersensibilidade ao veneno; danos à membrana celular dos cardiomiócitos; arritmias mediadas por toxinas, dentre outros (Liblik et al., 2022). Semelhantemente ao envenenamento por cobras, o loxoscelismo pode contribuir para possíveis complicações cardíacas por efeitos diretos ou indiretos do envenenamento, tais como a redução de perfusão, distúrbios hemostáticos e

sensibilização a componentes do veneno. Entretanto, não são complicações frequentes e há poucos relatos na literatura sobre o loxoscelismo e os distúrbios cardíacos gerados por ele. De toda forma, a aplicação do veneno foi capaz de elicitar arritmias nas cobaias estudadas.

É amplamente difundido na literatura que o secretoma do tecido adiposo epicárdico pode promover remodelamento eletromecânico do coração, reduzir a velocidade de condução e levar ao estabelecimento de bloqueios que favorecem arritmias por reentrada (Ernault et al., 2021). Entretanto, há uma relação estreita entre o tecido adiposo epicárdico e a obesidade, fatores que não se aplicam ao experimento realizado com as cobaias. O TA secreta adipocinas, que podem promover inflamação e, em maior proximidade ao tecido cardíaco, como no caso de gordura epicárdica, geram efeitos mais proeminentes (Abed et al., 2013).

Embora tenham sido discutidos os efeitos negativos do secretoma na condução e eletrofisiologia cardíacas e a possibilidade de gerar alterações de ritmo, existem, em contrapartida, indícios de que seu uso pode ser vantajoso. Liguori et al. (2025) realizaram a aplicação intraperitoneal de hidrogel com matriz extracelular cardíaca descelularizada associada a secretoma de TA em ratos com cardiomiopatia dilatada induzida por doxorubicina. Os animais tratados apresentaram menos fibrose miocárdica e melhor hemodinâmica ventricular no ecocardiograma. O secretoma pode exercer efeitos antiapoptóticos, anti-inflamatórios e antifibróticos nos cardiomiócitos e no tecido endotelial. Sua ação imunomodulatória induz as células vizinhas a liberarem citocinas benéficas (Ranganath et al., 2012). O seu uso em contextos inflamatórios parece diferir do seu uso em indivíduos saudáveis, como foi possível observar pelos ECGs no grupo C e os ECGs no grupo D. Ainda, os danos vasculares ocasionados pelo loxoscelismo (Oliveira-Lima et al., 2016) podem ter causado prejuízos à perfusão cardíaca e favorecido arritmias. Este efeito pode ter sido contrabalançado pelo secretoma.

## 6. Conclusões

Esse trabalho foi o primeiro estudo clínico realizado com o loxoscelismo sistêmico e seus impactos cardiovasculares. O envenenamento loxoscélico provocou alterações cardíacas e hematológicas relevantes, com efeitos agudos e prolongados. As evidências indicam que o veneno pode interferir diretamente na eletrofisiologia cardíaca, causando distúrbios mecânicos, assim como de condução e arritmias. Além disso, o veneno gerou lesões histológicas compatíveis com dano miocárdico e alterações hematológicas, como trombocitopenia, que também podem contribuir indiretamente para prejuízos na função cardíaca. O soro antiloxoscélico mostrou ação protetora parcial, enquanto o secretoma apresentou efeitos ambíguos, sugerindo potencial terapêutico, mas também riscos a depender da sua ação pró ou anti-inflamatória.

Os achados reforçam a complexidade da resposta fisiológica ao veneno de *Loxosceles intermedia* e à terapia com secretoma, destacando a importância de se considerar o contexto de uso terapêutico. Novas investigações, com maior número de indivíduos, diferentes doses e tempos de exposição, são necessárias para melhor elucidar os mecanismos envolvidos e as possíveis aplicações clínicas seguras do secretoma em cenários de cardiotoxicidade induzida por toxinas.

## 7. Referências bibliográficas

- Abed, H. S., Samuel, C. S., Lau, D. H., Kelly, D. J., Royce, S. G., Alasady, M., Mahajan, R., Kuklik, P., Zhang, Y., Brooks, A. G., Nelson, A. J., Worthley, S. G., Abhayaratna, W. P., Kalman, J. M., Wittert, G. A., & Sanders, P. (2013). Obesity results in progressive atrial structural and electrical remodeling: Implications for atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, *10*(1), 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2012.08.043>
- Araña, M., Mazo, M., Aranda, P., Pelacho, B., & Prosper, F. (2013). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, and Characterization. Em R. L. Kao (Org.), *Cellular Cardiomyoplasty: Methods and Protocols* (p. 47–61). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-511-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-511-8_4)
- Armstrong, R., Wheen, P., Brandon, L., Maree, A., & Kenny, R.-A. (2022). Heart rate: Control mechanisms, pathophysiology and assessment of the neurocardiac system in health and disease. *QJM: An International Journal of Medicine*, *115*(12), 806–812. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcab016>
- Askar, S. F. A., Ramkisoensing, A. A., Atsma, D. E., Schalij, M. J., de Vries, A. A. F., & Pijnappels, D. A. (2013). Engraftment Patterns of Human Adult Mesenchymal Stem Cells Expose Electrotonic and Paracrine Proarrhythmic Mechanisms in Myocardial Cell Cultures. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, *6*(2), 380–391. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.000215>
- Azuara-Antonio, O., Ortiz, M. I., Jimenez-Oliver, K. D., Hernandez-Cruz, L. E., Rivero-Veras, G., & Hernandez-Ramirez, L. (2023). Clinical Evolution After Administering Antivenom in Patients With Loxoscelism. *Journal of Medical Cases*, *14*(11), 378–386. <https://doi.org/10.14740/jmc4163>

- Barbaro, K. C., Cardoso, J. L. C., Eickstedt, V. R. D., & Mota, I. (1992). Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon*, *30*(3), 331–338.  
[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90873-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90873-4)
- Barrett, S. M., Romine-Jenkins, M., & Blick, K. E. (1993). Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clinical Chemistry*, *39*(10), 2104–2107.
- Berger, V., Gabriel, L., Lilliu, E., Hackl, B., Marksteiner, J., Hilber, K., Koenig, X., Uhrin, P., & Todt, H. (2023). Modulation of cardiac ventricular conduction: Impact on QRS duration, amplitude and dispersion. *European Journal of Pharmacology*, *941*, 175495.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175495>
- Bers, D. M. (1993). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* (V. 122). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-1512-6>
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, *415*(6868), 198–205.  
<https://doi.org/10.1038/415198a>
- Biesiadecki, B. J., Davis, J. P., Ziolo, M. T., & Janssen, P. M. L. (2014). Tri-modal regulation of cardiac muscle relaxation; intracellular calcium decline, thin filament deactivation, and cross-bridge cycling kinetics. *Biophysical Reviews*, *6*(3–4), 273–289.  
<https://doi.org/10.1007/s12551-014-0143-5>
- Bilousova, G., Jun, D. H., King, K. B., De Langhe, S., Chick, W. S., Torchia, E. C., Chow, K. S., Klemm, D. J., Roop, D. R., & Majka, S. M. (2011). Osteoblasts Derived from Induced Pluripotent Stem Cells form Calcified Structures in Scaffolds Both In Vitro and In Vivo. *STEM CELLS*, *29*(2), 206–216. <https://doi.org/10.1002/stem.566>
- Binford, G., Callahan, M., Bodner, M., Palmer, M., Berea, P., Ellison, C., & Duncan, R. (2008). Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* are consistent with

- Western Gondwanan vicariance. *Molecular phylogenetics and evolution*, 49, 538–553.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.08.003>
- Bissels, U., Eckardt, D., & Bosio, A. (2013). Characterization and Classification of Stem Cells. Em G. Steinhoff (Org.), *Regenerative Medicine: From Protocol to Patient* (p. 155–176). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5690-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5690-8_6)
- Blanch-Ruiz, M. A., Ortega-Luna, R., Martínez-Cuesta, M. Á., & Álvarez, Á. (2021). The Neutrophil Secretome as a Crucial Link between Inflammation and Thrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), Artigo 8.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22084170>
- Borgquist, R., Marinko, S., Platonov, P. G., Wang, L., Chaudhry, U., Brandt, J., & Mörtzell, D. (2023). Maximizing QRS duration reduction in contemporary cardiac resynchronization therapy is feasible and shorter QRS duration is associated with better clinical outcome. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, 66(8), 1799–1806. <https://doi.org/10.1007/s10840-022-01463-y>
- Botelho, A. F. M., Oliveira, M. S. D., Soto-Blanco, B., & Melo, M. M. (2016). Computerized electrocardiography in healthy conscious guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(12), 1203–1208. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2016001200011>
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641–648.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>

- Bunnell, B. A. (2021). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, *10*(12), 3433. <https://doi.org/10.3390/cells10123433>
- Caër, C., Rouault, C., Le Roy, T., Poitou, C., Aron-Wisnewsky, J., Torcivia, A., Bichet, J.-C., Clément, K., Guerre-Millo, M., & André, S. (2017). Immune cell-derived cytokines contribute to obesity-related inflammation, fibrogenesis and metabolic deregulation in human adipose tissue. *Scientific Reports*, *7*(1), 3000. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02660-w>
- Caporal, F. A., & Comar, S. R. (2013). Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *49*(5), 324–331. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442013000500005>
- Cappellini, M. D. (2007). Coagulation in the Pathophysiology of Hemolytic Anemias. *Hematology*, *2007*(1), 74–78. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.74>
- Cartledge, J. E., Kane, C., Dias, P., Tesfom, M., Clarke, L., Mckee, B., Al Ayoubi, S., Chester, A., Yacoub, M. H., Camelliti, P., & Terracciano, C. M. (2015). Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators. *Cardiovascular Research*, *105*(3), 260–270. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu264>
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., & MacDougald, O. A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: Going back to the future. *Journal of Lipid Research*, *53*(2), 227–246. <https://doi.org/10.1194/jlr.R021089>
- Chaim, O. M., Sade, Y. B., Da Silveira, R. B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olórtegui, C., Mangili, O. C., Gremski, W., Von Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Sanches Veiga, S. (2006). Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *211*(1), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.05.015>

- Chaim, O. M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A. C. M., Ferrer, V. P., Matsubara, F. H., Mangili, O. C., da Silveira, R. B., Gremski, L. H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2011). Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Tools for biological purposes. *Toxins*, 3(3), 309–344. <https://doi.org/10.3390/toxins3030309>
- Chaves-Moreira, D., Matsubara, F. H., Schemczssen-Graeff, Z., De Bona, E., Heidemann, V. R., Guerra-Duarte, C., Gremski, L. H., Chávez-Olórtegui, C., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., Arni, R. K., & Veiga, S. S. (2019). Brown Spider (*Loxosceles*) Venom Toxins as Potential Biotools for the Development of Novel Therapeutics. *Toxins*, 11(6), 355. <https://doi.org/10.3390/toxins11060355>
- Chávez-Olórtegui, C., Zanetti, V. C., Ferreira, A. P., Minozzo, J. C., Mangili, O. C., & Gubert, I. C. (1998). ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 36(4), 563–569. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(97\)00159-1](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(97)00159-1)
- Chen, J., Tang, Y.-X., Liu, Y.-M., Chen, J., Hu, X.-Q., Liu, N., Wang, S.-X., Zhang, Y., Zeng, W.-G., Ni, H.-J., Zhao, B., Chen, Y.-F., & Tang, Z.-P. (2012). Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells is Associated with Neural Differentiation and Functional Improvement in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(10), 847–854. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2012.00382.x>
- Chen, L. Y., & Soliman, E. Z. (2019). P Wave Indices-Advancing Our Understanding of Atrial Fibrillation-Related Cardiovascular Outcomes. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 53. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00053>
- Chen, Z., Ilagan, F., Heng, P., & Prasad, V. (2023). A-146 A Review of RDW-CV and RDW-SD Measurements in Patients With Iron Deficiency Anemia in an Acute Care Hospital

in Singapore. *Clinical Chemistry*, 69(Supplement\_1), hvad097.133.

<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvad097.133>

Chorro, F. J., Such-Belenguer, L., & López-Merino, V. (2009). Modelos animales de enfermedad cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*, 62(1), 69–84.

[https://doi.org/10.1016/S0300-8932\(09\)70023-5](https://doi.org/10.1016/S0300-8932(09)70023-5)

Chu, D.-T., Nguyen Thi Phuong, T., Tien, N. L. B., Tran, D. K., Minh, L. B., Thanh, V. V., Gia Anh, P., Pham, V. H., & Thi Nga, V. (2019). Adipose Tissue Stem Cells for Therapy: An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application.

*Journal of Clinical Medicine*, 8(7), 917. <https://doi.org/10.3390/jcm8070917>

Cohen, M., & Triedman, J. (2014). Guidelines for Management of Asymptomatic Ventricular Pre-excitation. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 7(2), 187–189.

<https://doi.org/10.1161/CIRCEP.114.001528>

Cooper, D. R., Wang, C., Patel, R., Trujillo, A., Patel, N. A., Prather, J., Gould, L. J., & Wu, M. H. (2018). Human Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Media and Exosomes Containing MALAT1 Promote Human Dermal Fibroblast Migration and Ischemic Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 7(9), 299–308.

<https://doi.org/10.1089/wound.2017.0775>

Cristina De Oliveira-Lima, K., Farsky, S. H. P., Lopes, P. H., De Andrade, R. M. G., Van Den Berg, C. W., & Tambourgi, D. V. (2016). Microcirculation abnormalities provoked by *Loxosceles* spiders' envenomation. *Toxicon*, 116, 35–42.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.005>

da Silva, P. H., da Silveira, R. B., Appel, M. H., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S.

(2004). Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 44(7), 693–709. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.07.012>

- Da Silva, P. H., Hashimoto, Y., Dos Santos, F. A., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2003a). Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, 42(2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00127-2)
- Da Silva, P. H., Hashimoto, Y., Dos Santos, F. A., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2003b). Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, 42(2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00127-2)
- Da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., & Veiga, S. S. (2007). Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- $\beta$ -N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, 49(6), 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.024>
- Dahl, R., & Berg, R. (2020). Trigonometry of the ECG: A formula for the mean electrical axis of the heart. *Physiology News*. <https://doi.org/10.36866/pn.120.25>
- Damayanti, R. H., Rusdiana, T., & Wathoni, N. (2021). Mesenchymal Stem Cell Secretome for Dermatology Application: A Review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 14, 1401–1412. <https://doi.org/10.2147/CCID.S331044>
- Dantas, A. E., Carmo, A. O., Horta, C. C. R., Leal, H. G., Oliveira-Mendes, B. B. R., Martins, A. P. V., Chávez-Olórtegui, C., & Kalapothakis, E. (2016). Description of Loxtox protein family and identification of a new group of Phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 120, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.002>
- de Almeida, M. E. (s. d.). *Universidade Federal de Minas Gerais Escola de Veterinária Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal*.

- De Gregorio, C., Contador, D., Díaz, D., Cárcamo, C., Santapau, D., Lobos-Gonzalez, L., Acosta, C., Campero, M., Carpio, D., Gabriele, C., Gaspari, M., Aliaga-Tobar, V., Maracaja-Coutinho, V., Ezquer, M., & Ezquer, F. (2020). Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium ameliorates polyneuropathy and foot ulceration in diabetic BKS db/db mice. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01680-0>
- de Oliveira Christoff, A., de Oliveira, A., Chaim, O. M., Lugarini, D., Bastos Pereira, A. L., Paludo, K. S., Queiroz Telles, J. E., Bracht, A., Veiga, S. S., & Acco, A. (2008). Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. *Toxicon*, *52*(6), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.08.001>
- Detweiler, D. K. (2010). The Mammalian Electrocardiogram: Comparative Features. Em P. W. Macfarlane, A. van Oosterom, O. Pahlm, P. Kligfield, M. Janse, & J. Camm (Org.), *Comprehensive Electrocardiology* (p. 1909–1947). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-84882-046-3\\_42](https://doi.org/10.1007/978-1-84882-046-3_42)
- Dhamoon, A. S., & Jalife, J. (2005). The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*, *2*(3), 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2004.11.012>
- Dias-Lopes, C., Felicori, L., Guimarães, G., Gomes, E. R. M., Roman-Campos, D., Duarte, H., Damasceno, D., Martins, M., Kalapothakis, E., Almeida, A. P., Granier, C., Cruz, J. S., Guatimosim, S., & Chávez-Olórtegui, C. (2010). Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. *Toxicon*, *56*(8), 1426–1435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.08.008>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy

position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.

<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

dos Santo, V. L., Franco, C. R., Viggiano, R. L., da Silveira, R. B., Cantão, M. P., Mangili, O. C., Veiga, S. S., & Gremski, W. (2000). Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 38(2), 265–285.

[https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00155-5](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00155-5)

Dozois, E. J., Lightner, A. L., Dietz, A. B., Fletcher, J. G., Lee, Y. S., Friton, J. J., & Faubion, W. A. (2023). Durable Response in Patients With Refractory Fistulizing Perianal Crohn's Disease Using Autologous Mesenchymal Stem Cells on a Dissolvable Matrix: Results from the Phase I Stem Cell on Matrix Plug Trial. *Diseases of the Colon and Rectum*, 66(2), 243–252. <https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000002579>

Dragoo, J. L., Shapiro, S. A., Bradsell, H., & Frank, R. M. (2021). The essential roles of human adipose tissue: Metabolic, thermoregulatory, cellular, and paracrine effects. *Journal of Cartilage & Joint Preservation*, 1(3), 100023.

<https://doi.org/10.1016/j.jcjp.2021.100023>

Eisner, D. (2014). Calcium in the heart: From physiology to disease. *Experimental Physiology*, 99(10), 1273–1282. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.077305>

Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Kistamás, K., & Trafford, A. W. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research*, 121(2), 181–195. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310230>

Eisner, D. A., Choi, H. S., Díaz, M. E., O'Neill, S. C., & Trafford, A. W. (2000). Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circulation Research*, 87(12), 1087–1094. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.12.1087>

- Ernault, A. C., Meijborg, V. M. F., & Coronel, R. (2021). Modulation of Cardiac Arrhythmogenesis by Epicardial Adipose Tissue. *Journal of the American College of Cardiology*, 78(17), 1730–1745. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.08.037>
- Ernault, A. C., Verkerk, A. O., Bayer, J. D., Aras, K., Montañés-Agudo, P., Mohan, R. A., Veldkamp, M., Rivaud, M. R., De Winter, R., Kawasaki, M., Van Amersfoorth, S. C. M., Meulendijks, E. R., Driessen, A. H. G., Efimov, I. R., De Groot, J. R., & Coronel, R. (2022). Secretome of atrial epicardial adipose tissue facilitates reentrant arrhythmias by myocardial remodeling. *Heart Rhythm*, 19(9), 1461–1470. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2022.05.011>
- Fernandes, P. B. U. (s. d.). *Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal*.
- Fernandes-Pedrosa, M. de F., Junqueira-de-Azevedo, I. de L. M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Kobashi, L. S., Almeida, D. D., Ho, P. L., & Tambourgi, D. V. (2008). Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics*, 9, 279. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-279>
- Fukuda, N., Sasaki, D., Ishiwata, S., & Kurihara, S. (2001). Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: Role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Circulation*, 104(14), 1639–1645. <https://doi.org/10.1161/hc3901.095898>
- Futrell, J. M. (1992). Loxoscelism. *The American Journal of the Medical Sciences*, 304(4), 261–267. <https://doi.org/10.1097/00000441-199210000-00008>
- Garcia-Olmo, D., Gilaberte, I., Binek, M., D Hoore, A. J. L., Lindner, D., Selvaggi, F., Spinelli, A., & Panés, J. (2022). Follow-up Study to Evaluate the Long-term Safety and Efficacy of Darvadstrocel (Mesenchymal Stem Cell Treatment) in Patients With Perianal Fistulizing Crohn's Disease: ADMIRE-CD Phase 3 Randomized Controlled

Trial. *Diseases of the Colon and Rectum*, 65(5), 713–720.

<https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000002325>

- Geren, C. R., Chan, T. K., Howell, D. E., & Odell, G. V. (1976). Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 174(1), 90–99. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90327-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90327-1)
- Ghasemi, M., Roshandel, E., Mohammadian, M., Farhadhosseinabadi, B., Akbarzadehlaleh, P., & Shamsasenjan, K. (2023). Mesenchymal stromal cell-derived secretome-based therapy for neurodegenerative diseases: Overview of clinical trials. *Stem Cell Research & Therapy*, 14(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03264-0>
- Ghosh, A., Datta, P., & Dhingra, M. (2023). Higher Levels of Creatine Kinase MB (CK-MB) Than Total Creatine Kinase (CK): A Biochemistry Reporting Error or an Indicator of Other Pathologies? *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.50792>
- Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2005). Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochemistry. Biokhimiia*, 70(8), 948–952. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0207-z>
- Grant, A. O. (2009). Cardiac Ion Channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(2), 185–194. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.789081>
- Gremski, L. H., da Justa, H. C., da Silva, T. P., Polli, N. L. C., Antunes, B. C., Minozzo, J. C., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., Arni, R. K., & Veiga, S. S. (2020). Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. *Toxins*, 12(3), 164. <https://doi.org/10.3390/toxins12030164>
- Gremski, L. H., da Justa, H. C., Polli, N. L. C., Schluga, P. H. de C., Theodoro, J. L., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2022). Systemic Loxoscelism, Less Frequent

- but More Deadly: The Involvement of Phospholipases D in the Pathophysiology of Envenomation. *Toxins*, 15(1), 17. <https://doi.org/10.3390/toxins15010017>
- Gremski, L. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Probst, C. M., Ferrer, V. P., Nowatzki, J., Weinschutz, H. C., Madeira, H. M., Gremski, W., Nader, H. B., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2010). A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Molecular bioSystems*, 6(12), 2403–2416. <https://doi.org/10.1039/c004118a>
- Gremski, L. H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V. P., Matsubara, F. H., Meissner, G. O., Wille, A. C. M., Vuitika, L., Dias-Lopes, C., Ullah, A., de Moraes, F. R., Chávez-Olórtegui, C., Barbaro, K. C., Murakami, M. T., Arni, R. K., Senff-Ribeiro, A., Chaim, O. M., & Veiga, S. S. (2014). Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 83, 91–120. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.023>
- Guan, Y., Wen, J., Niu, H., Zhai, J., Dang, Y., & Guan, J. (2025a). Targeted delivery of engineered adipose-derived stem cell secretome to promote cardiac repair after myocardial infarction. *Journal of Controlled Release*, 383, 113765. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113765>
- Guan, Y., Wen, J., Niu, H., Zhai, J., Dang, Y., & Guan, J. (2025b). Targeted delivery of engineered adipose-derived stem cell secretome to promote cardiac repair after myocardial infarction. *Journal of Controlled Release*, 383, 113765. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.113765>
- Guerra, F., Giannini, I., Pongetti, G., Fabbrizioli, A., Rrapaj, E., Aschieri, D., Pelizzoni, V., Villani, G. Q., Madias, J. E., & Capucci, A. (2015). Transient QRS amplitude attenuation is associated with clinical recovery in patients with takotsubo

cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, 187, 198–205.

<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.350>

Guglin, M., & Curtis, A. B. (2013). QRS Duration Criteria to Select Patients for Cardiac Resynchronization Therapy: Cardiac Resynchronization Therapy: 150 Is Not A Magic Number! *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 6(2), 429–435.

<https://doi.org/10.1161/CIRCEP.112.970939>

Guo, L., Dong, Z., & Guthrie, H. (2009). Validation of a guinea pig Langendorff heart model for assessing potential cardiovascular liability of drug candidates. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 60(2), 130–151.

<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.07.002>

Han, X., Liao, R., Li, X., Zhang, C., Huo, S., Qin, L., Xiong, Y., He, T., Xiao, G., & Zhang, T. (2025). Mesenchymal stem cells in treating human diseases: Molecular mechanisms and clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 262.

<https://doi.org/10.1038/s41392-025-02313-9>

Hani, R., Khayat, L., Rahman, A. A., & Alaaeddine, N. (2023). Effect of stem cell secretome in skin rejuvenation: A narrative review. *Molecular Biology Reports*, 50(9), 7745–7758. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08622-y>

Hanna, E. B., & Glancy, D. L. (2011). ST-segment depression and T-wave inversion: Classification, differential diagnosis, and caveats. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 78(6), 404–414. <https://doi.org/10.3949/ccjm.78a.10077>

Hannibal, G. B. (2014). Interpretation of the Low-Voltage ECG. *AACN Advanced Critical Care*, 25(1), 64–68. <https://doi.org/10.4037/NCI.0000000000000001>

He, L., Nguyen, N. B., Ardehali, R., & Zhou, B. (2020). Heart Regeneration by Endogenous Stem Cells and Cardiomyocyte Proliferation: Controversy, Fallacy, and Progress.

*Circulation*, 142(3), 275–291.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.045566>

He, S., Long, L., Wang, Z., Liu, W., Zhang, W., Hu, C., Wu, X., Dong, R., Fan, H., Qing-Jiang, Tong, Y., Yang, G., Li-Yang, & Wang, Y. (2023). Combining HUMSC secretome and a conductive hydrogel enhances angiogenesis and electrical transmission at myocardial infarct sites to support cardiac repair. *Chemical Engineering Journal*, 474, 145877. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145877>

He, Y., Xia, J., Chen, H., Wang, L., Deng, C., & Lu, F. (2019). Human adipose liquid extract induces angiogenesis and adipogenesis: A novel cell-free therapeutic agent. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 252. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1356-0>

Heitz, J. R., & Norment, B. R. (1974). Characteristics of an alkaline phosphatase activity in brown recluse venom. *Toxicon*, 12(2), 181–187. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(74\)90243-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(74)90243-8)

Henry, T. D., Pepine, C. J., Lambert, C. R., Traverse, J. H., Schatz, R., Costa, M., Povsic, T. J., David Anderson, R., Willerson, J. T., Kesten, S., & Perin, E. C. (2017). The Athena trials: Autologous adipose-derived regenerative cells for refractory chronic myocardial ischemia with left ventricular dysfunction. *Catheterization and Cardiovascular Interventions: Official Journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 89(2), 169–177. <https://doi.org/10.1002/ccd.26601>

Hogan, C. J., Barbaro, K. C., & Winkel, K. (2004). Loxoscelism: Old obstacles, new directions. *Annals of Emergency Medicine*, 44(6), 608–624. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2004.08.028>

Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., & Sandhoff, K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1485(2–3), 63–99. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00042-1)

- Jacobs, J. W., Bastarache, L., & Thompson, M. A. (2022). Laboratory Predictors of Hemolytic Anemia in Patients With Systemic Loxoscelism. *American Journal of Clinical Pathology*, *157*(4), 566–572. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqab169>
- Joukar, S. (2021). A comparative review on heart ion channels, action potentials and electrocardiogram in rodents and human: Extrapolation of experimental insights to clinic. *Laboratory Animal Research*, *37*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00102-3>
- Kalapothis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., De Castro, C. S., Silvestre, F. G., Laborne, F. V., De Moura, J. F., Veiga, S. S., Chávez-Olórtegui, C., Granier, C., & Barbaro, K. C. (2007). The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom. *Toxicon*, *50*(7), 938–946. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.07.001>
- Kijawornrat, A., Sawangkoon, S., Simonetti, O., & Hamlin, R. (2011). Body Surface Potentials Generated by the Heart of Normal Guinea Pigs. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, *41*, 463–469. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.2338>
- Kim, W.-S., Park, B.-S., Sung, J.-H., Yang, J.-M., Park, S.-B., Kwak, S.-J., & Park, J.-S. (2007). Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, *48*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.05.018>
- Kingma, J., Simard, C., & Drolet, B. (2023). Overview of Cardiac Arrhythmias and Treatment Strategies. *Pharmaceuticals*, *16*(6), 844. <https://doi.org/10.3390/ph16060844>
- Kodali, M., Shortridge, J., & Doll, D. (2014). Severe Hemolysis in Systemic Loxoscelism. *Blood*, *124*(21), 4871. <https://doi.org/10.1182/blood.V124.21.4871.4871>

- Kolimi, P., Narala, S., Nyavanandi, D., Youssef, A. A. A., & Dudhipala, N. (2022). Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*, *11*(15), 2439. <https://doi.org/10.3390/cells11152439>
- Kusma, J., Chaim, O. M., Wille, A. C. M., Ferrer, V. P., Sade, Y. B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O. C., & Veiga, S. S. (2008). Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie*, *90*(11–12), 1722–1736. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.07.011>
- Kwong, J. Q. (2017). The mitochondrial calcium uniporter in the heart: Energetics and beyond. *The Journal of Physiology*, *595*(12), 3743–3751. <https://doi.org/10.1113/JP273059>
- Laberge, A., Arif, S., & Moulin, V. J. (2018). Microvesicles: Intercellular messengers in cutaneous wound healing. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(8), 5550–5563. <https://doi.org/10.1002/jcp.26426>
- Lalu, M. M., McIntyre, L., Pugliese, C., Fergusson, D., Winston, B. W., Marshall, J. C., Granton, J., Stewart, D. J., & Canadian Critical Care Trials Group. (2012). Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PloS One*, *7*(10), e47559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559>
- Langner, T. R., Ganatra, H. A., Schwerdtfager, J., Stoecker, W., & Thornton, S. (2021). Viscerocutaneous Loxoscelism Manifesting with Myocarditis: A Case Report. *American Journal of Case Reports*, *22*, 0–0. <https://doi.org/10.12659/AJCR.932378>
- Lazzerini, P. E., Laghi-Pasini, F., Boutjdir, M., & Capecchi, P. L. (2022). Inflammatory cytokines and cardiac arrhythmias: The lesson from COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, *22*(5), 270–272. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00714-3>

- Lee, J. S., Hong, J. M., Moon, G. J., Lee, P. H., Ahn, Y. H., Bang, O. Y., & STARTING collaborators. (2010). A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(6), 1099–1106. <https://doi.org/10.1002/stem.430>
- Lee, W.-S., Kim, H. J., Kim, K.-I., Kim, G. B., & Jin, W. (2019). Intra-Articular Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Phase IIb, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(6), 504–511. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0122>
- Li, J.-Y., Ren, K.-K., Zhang, W.-J., Xiao, L., Wu, H.-Y., Liu, Q.-Y., Ding, T., Zhang, X.-C., Nie, W.-J., Ke, Y., Deng, K.-Y., Liu, Q.-W., & Xin, H.-B. (2019). Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1366-y>
- Li, L., Ngo, H. T. T., Hwang, E., Wei, X., Liu, Y., Liu, J., & Yi, T.-H. (2020). Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), Artigo 1. <https://doi.org/10.3390/ijms21010049>
- Liblik, K., Byun, J., Saldarriaga, C., Perez, G. E., Lopez-Santi, R., Wyss, F. Q., Liprandi, A. S., Martinez-Sellés, M., Farina, J. M., Mendoza, I., Burgos, L. M., & Baranchuk, A. (2022). Snakebite Envenomation and Heart: Systematic Review. *Current Problems in Cardiology*, 47(9), 100861. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2021.100861>
- Liguori, T. T. A., Liguori, G. R., Sinkunas, V., Correia, C. J., Dos Santos Coutinho E Silva, R., Zanoni, F. L., Aiello, V. D., Harmsen, M. C., & Moreira, L. F. P. (2025).

- Intrapericardial injection of hydrogels with ASC and their secretome to treat dilated cardiomyopathies. *Scientific Reports*, *15*(1), 3529. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87939-z>
- Lin, Y.-K., Chen, Y.-C., Chen, J.-H., Chen, S.-A., & Chen, Y.-J. (2012). Adipocytes modulate the electrophysiology of atrial myocytes: Implications in obesity-induced atrial fibrillation. *Basic Research in Cardiology*, *107*(5), 293. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0293-1>
- Lindsey, M. L., & Gundry, R. L. (2020). Secrets of Cardiac Remodeling Revealed in the Secretome. *Circulation*, *141*(20), 1645–1647. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046042>
- Liu, Y., Wang, C., Wei, M., Yang, G., & Yuan, L. (2021). Multifaceted Roles of Adipose Tissue-Derived Exosomes in Physiological and Pathological Conditions. *Frontiers in Physiology*, *12*, 669429. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.669429>
- Lopes, P. H., Squaiella-Baptistão, C. C., Marques, M. O. T., & Tambourgi, D. V. (2020). Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: Literature and case review. *Archives of Toxicology*, *94*(5), 1461–1477. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02719-0>
- Lucas, S. M. (2015). The history of venomous spider identification, venom extraction methods and antivenom production: A long journey at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *21*, 21. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0020-0>
- Luciano, M. N., Da Silva, P. H., Chaim, O. M., Dos Santos, V. L. P., Franco, C. R. C., Soares, M. F. S., Zanata, S. M., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2004). Experimental Evidence for a Direct Cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown

- Spider) Venom in Renal Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(4), 455–467. <https://doi.org/10.1177/002215540405200404>
- Macchiavello, A. (1947). Cutaneous arachnoidism experimentally produced with the glandular poison of *Loxosceles laeta*. *The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine*, 23(2), 266-279. Spanish transl. 280-293.
- Malik, M., Färbom, P., Batchvarov, V., Hnatkova, K., & Camm, A. J. (2002). Relation between QT and RR intervals is highly individual among healthy subjects: Implications for heart rate correction of the QT interval. *Heart*, 87(3), 220–228. <https://doi.org/10.1136/heart.87.3.220>
- Mantopoulos, D., Hendershot, A. J., Cebulla, C. M., & Hirsh, D. K. (2016). Bilateral optic neuropathy following bite from brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 35(2), 168–172. <https://doi.org/10.3109/15569527.2015.1027906>
- Martins, G. D. C., Barreto, M. S. O., Botelho, A. F. M., Gamba, C., Duarte, C. G., Soto-Blanco, B., Bicalho, A. P. C.-V., Cassali, G. D., Goes, A. M. D., Olórtégui, C. D. C., & Melo, M. M. (2022). Avaliação de células mesenquimais e dapsona para o tratamento de feridas dermonecróticas causadas pelo veneno de *Loxosceles laeta* em coelhos. *Ciência Animal Brasileira*, 23, e-72573E. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v23e-72573p>
- McDermott, M., Wakelam, M. J. O., & Morris, A. J. (2004). Phospholipase D. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 82(1), 225–253. <https://doi.org/10.1139/o03-079>
- Menasché, P., Renault, N. K., Hagege, A., Puscas, T., Bellamy, V., Humbert, C., Le, L., Blons, H., Granier, C., Benhamouda, N., Bacher, A., Churlaud, G., Sabatier, B., & Larghero,

- J. (2024). First-in-man use of a cardiovascular cell-derived secretome in heart failure. Case report. *EBioMedicine*, *103*, 105145. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105145>
- Metivier, F., Marchais, S. J., Guerin, A. P., Pannier, B., & London, G. M. (2000). Pathophysiology of anaemia: Focus on the heart and blood vessels. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *15 Suppl 3*, 14–18. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.ndt.a027970>
- Milan, P. B., Lotfibakhshaiesh, N., Joghataie, M. T., Ai, J., Pazouki, A., Kaplan, D. L., Kargozar, S., Amini, N., Hamblin, M. R., Mozafari, M., & Samadikuchaksaraei, A. (2016). Accelerated wound healing in a diabetic rat model using decellularized dermal matrix and human umbilical cord perivascular cells. *Acta Biomaterialia*, *45*, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.053>
- Mithoowani, S., Laureano, M., Crowther, M. A., & Hillis, C. M. (2020). Investigation and management of erythrocytosis. *Canadian Medical Association Journal*, *192*(32), E913–E918. <https://doi.org/10.1503/cmaj.191587>
- Mondal, H., & Budh, D. (2020). *Hematocrit (HCT)*.
- Mukhamedshina, Y., Shulman, I., Ogurcov, S., Kostennikov, A., Zakirova, E., Akhmetzyanova, E., Rogozhin, A., Masgutova, G., James, V., Masgutov, R., Lavrov, I., & Rizvanov, A. (2019). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Spinal Cord Contusion: A Comparative Study on Small and Large Animal Models. *Biomolecules*, *9*(12), 811. <https://doi.org/10.3390/biom9120811>
- Munoz-Perez, E., Gonzalez-Pujana, A., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., & Hernandez, R. M. (2021). Mesenchymal Stromal Cell Secretome for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases: Latest Trends in Isolation, Content Optimization and Delivery

Avenues. *Pharmaceutics*, 13(11), Artigo 11.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111802>

Nanchen, D., Leening, M. J. G., Locatelli, I., Cornuz, J., Kors, J. A., Heeringa, J., Deckers, J. W., Hofman, A., Franco, O. H., Stricker, B. H. Ch., Witteman, J. C. M., & Dehghan, A. (2013). Resting Heart Rate and the Risk of Heart Failure in Healthy Adults: The Rotterdam Study. *Circulation: Heart Failure*, 6(3), 403–410.

<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000171>

Navarro-Martinez, D. A., Berarducci, J., Armenta-Moreno, J. I., Armendariz-Ferrari, J. C., Garcia-Cardenas, M., Fernandez-Badillo, V., & Espinola-Zavaleta, N. (2022). Kounis Syndrome: Acute Coronary Syndrome Induced by a *Loxosceles Laeta* Bite in a 9-Year-Old Boy. *CASE : Cardiovascular Imaging Case Reports*, 6(10), 450–453.

<https://doi.org/10.1016/j.case.2022.09.001>

Navinan, M. R., & Wijeyaratne, D. R. (2024). Cardiac involvement in Scorpion envenomation: A review of literature. *Indonesian Journal of Cardiology*, 45(2), 104–117. <https://doi.org/10.30701/ijc.1710>

Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization.

*Physiological Reviews*, 85(4), 1205–1253. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>

Nguyen, N., & Pandey, M. (2019). Loxoscelism: Cutaneous and Hematologic Manifestations.

*Advances in Hematology*, 2019, 4091278. <https://doi.org/10.1155/2019/4091278>

Ospedal, K. Z., Appel, M. H., Neto, J. F., Mangili, O. C., Veiga, S. S., & Gremski, W. (2002).

Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *International Journal of Experimental Pathology*, 83(6), 287–294. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2002.00241.x>

Padilla-Carlin, D. J., McMurray, D. N., & Hickey, A. J. (2008). The Guinea Pig as a Model of Infectious Diseases. *Comparative Medicine*, 58(4), 324–340.

- Park, J.-K., Park, J., Uhm, J.-S., Joung, B., Lee, M.-H., & Pak, H.-N. (2016). Low P-wave amplitude (<0.1 mV) in lead I is associated with displaced inter-atrial conduction and clinical recurrence of paroxysmal atrial fibrillation after radiofrequency catheter ablation. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology*, *18*(3), 384–391.  
<https://doi.org/10.1093/europace/euv028>
- Park, S.-R., Kim, J.-W., Jun, H.-S., Roh, J. Y., Lee, H.-Y., & Hong, I.-S. (2018). Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular Therapy*, *26*(2), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.023>
- Pedrotty, D. M., Klinger, R. Y., Kirkton, R. D., & Bursac, N. (2009). Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *83*(4), 688–697.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvp164>
- Pelliccia, A., Drezner, J. A., Zorzi, A., & Corrado, D. (2024). Prevalence and clinical significance of low QRS voltages in healthy individuals, athletes, and patients with cardiomyopathy: Implications for sports pre-participation cardiovascular screening. *European Journal of Preventive Cardiology*, *31*(9), 1106–1114.  
<https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwae027>
- Pereira, N., Kalapothakis, E., Vasconcelos, A., Chatzaki, M., Campos, L., Vieira, F., Verçosa, B., Silva, S., Ferreira, W., & Moro, L. (2012). Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *18*(3), 277–286. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000300005>

- Peterson, B. Z., DeMaria, C. D., Adelman, J. P., & Yue, D. T. (1999). Calmodulin is the Ca<sup>2+</sup> sensor for Ca<sup>2+</sup> -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, 22(3), 549–558. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80709-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80709-6)
- Pichardo-Rodriguez, R., Grandez-Urbina, J. A., Zegarra Del Rosario-Alvarado, S., Del Carpio-Yañez, V. A., Saavedra-Velasco, M., & Garcia-Perdomo, H. A. (2020). Systemic loxoscelism in an epileptic patient. Case report. *Revista Científica de La Sociedad de Enfermería Neurológica (English Ed.)*, 52, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.sedeng.2019.10.004>
- Pinnell, J., Turner, S., & Howell, S. (2007). Cardiac muscle physiology. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 7(3), 85–88. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkm013>
- Platnick, N. I. (2000). *The World Spider Catalog* [Conjunto de datos].
- Poole, J. E., Singh, J. P., & Birgersdotter, -Green Ulrika. (2016). QRS Duration or QRS Morphology. *JACC*, 67(9), 1104–1117. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.12.039>
- Qiu, H., Liu, S., Wu, K., Zhao, R., Cao, L., & Wang, H. (2020). Prospective application of exosomes derived from adipose-derived stem cells in skin wound healing: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(3), 574–581. <https://doi.org/10.1111/jocd.13215>
- Rahimi, B., Panahi, M., Saraygord-Afshari, N., Taheri, N., Bilici, M., Jafari, D., & Alizadeh, E. (2021). The secretome of mesenchymal stem cells and oxidative stress: Challenges and opportunities in cell-free regenerative medicine. *Molecular Biology Reports*, 48(7), 5607–5619. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06360-7>
- Ramu, Y., Xu, Y., & Lu, Z. (2006). Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature*, 442(7103), 696–699. <https://doi.org/10.1038/nature04880>

- Ranganath, S. H., Levy, O., Inamdar, M. S., & Karp, J. M. (2012). Harnessing the Mesenchymal Stem Cell Secretome for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Cell Stem Cell*, *10*(3), 244–258. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.005>
- Ranjbar, A., Hassanzadeh, H., Jahandoust, F., Miri, R., Bidkhori, H. R., Monzavi, S. M., Sanjar-Moussavi, N., Matin, M. M., & Shariati-Sarabi, Z. (2022). Allogeneic adipose-derived mesenchymal stromal cell transplantation for refractory lupus nephritis: Results of a phase I clinical trial. *Current Research in Translational Medicine*, *70*(2), 103324. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2021.103324>
- Raposo, E., & Bertozzi, N. (2017). Isolation of Ready-to-Use Adipose-Derived Stem Cell (ASC) Pellet for Clinical Applications and a Comparative Overview of Alternate Methods for ASC Isolation. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, *41*, 1F.17.1-1F.17.12. <https://doi.org/10.1002/cpsc.29>
- Rasulov, M. F., Vasilchenkov, A. V., Onishchenko, N. A., Krashennnikov, M. E., Kravchenko, V. I., Gorshenin, T. L., Pidtsan, R. E., & Potapov, I. V. (2005). First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *139*(1), 141–144. <https://doi.org/10.1007/s10517-005-0232-3>
- Ríos, E. (2018). Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *The Journal of General Physiology*, *150*(4), 521–537. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711959>
- Robert, A. W., Azevedo Gomes, F., Rode, M. P., Marques Da Silva, M., Veleirinho, M. B. D. R., Maraschin, M., Hayashi, L., Wosgrau Calloni, G., & Stimamiglio, M. A. (2019). The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *Journal of Tissue Engineering*, *10*, 2041731419833391. <https://doi.org/10.1177/2041731419833391>

- Rodrigues, G. M., Almeida, M. E. D., Marcelino, S. A. C., Fernandes, P. B. U., Cruz, J. O. P. D., Araújo, F. L., Ferreira, R. D. S., Botelho, A. F. M., Bedoya, F. J., Cahuana, G. M., Hitos, A. B., Soria, B., Costal-Oliveira, F., Duarte, C. G., Tejedó, J. R., Chávez-Olórtegui, C., & Melo, M. M. (2024a). Protective effects of mesenchymal stromal cell-derived secretome on dermonecrosis induced in rabbits by *Loxosceles intermedia* spider venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 30, e20240004. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2024-0004>
- Rodrigues, G. M., Almeida, M. E. D., Marcelino, S. A. C., Fernandes, P. B. U., Cruz, J. O. P. D., Araújo, F. L., Ferreira, R. D. S., Botelho, A. F. M., Bedoya, F. J., Cahuana, G. M., Hitos, A. B., Soria, B., Costal-Oliveira, F., Duarte, C. G., Tejedó, J. R., Chávez-Olórtegui, C., & Melo, M. M. (2024b). Protective effects of mesenchymal stromal cell-derived secretome on dermonecrosis induced in rabbits by *Loxosceles intermedia* spider venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 30, e20240004. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2024-0004>
- Sadri, B., Tamimi, A., Nouraein, S., Bagheri Fard, A., Mohammadi, J., Mohammadpour, M., Hassanzadeh, M., Bajouri, A., Madani, H., Barekat, M., Karimi Torshizi, S., Malek, M., Ghorbani Liastani, M., Beheshti Maal, A., Niknejadi, M., & Vosough, M. (2022). Clinical and laboratory findings following transplantation of allogeneic adipose-derived mesenchymal stromal cells in knee osteoarthritis, a brief report. *Connective Tissue Research*, 63(6), 663–674. <https://doi.org/10.1080/03008207.2022.2074841>
- Sanchez-Castro, E. E., Pajuelo-Reyes, C., Tejedó, R., Soria-Juan, B., Tapia-Limonchi, R., Andreu, E., Hitos, A. B., Martín, F., Cahuana, G. M., Guerra-Duarte, C., de Assis, T. C. S., Bedoya, F. J., Soria, B., Chávez-Olórtegui, C., & Tejedó, J. R. (2021). Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies as Promising Treatments for Muscle

- Regeneration After Snakebite Envenoming. *Frontiers in Immunology*, *11*, 609961.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.609961>
- Santilli, R., Moïse, S., Pariaut, R., & Perego, M. (2019). *Electrocardiography of the dog and cat. 2nd edition: Diagnosis of arrhythmias*. Edra.
- Sapag, A., Salinas-Luypaert, C., & Constenla-Muñoz, C. (2014). First report of in vitro selection of RNA aptamers targeted to recombinant *Loxosceles laeta* spider toxins. *Biological Research*, *47*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-2>
- Sari, M. I., Jusuf, N. K., Munir, D., Putra, A., Bisri, T., Ilyas, S., Farhat, F., Muhar, A. M., Rusda, M., & Amin, M. M. (2023). The Role of Mesenchymal Stem Cell Secretome in the Inflammatory Mediators and the Survival Rate of Rat Model of Sepsis. *Biomedicines*, *11*(8), 2325. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082325>
- Saviñon-Flores, A. I., Saviñon-Flores, F., Trejo, G., Méndez, E., Țălu, Ș., González-Fuentes, M. A., & Méndez-Albores, A. (2022). A review of cardiac troponin I detection by surface enhanced Raman spectroscopy: Under the spotlight of point-of-care testing. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 1017305. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1017305>
- Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O. M., Gremski, L. H., Paludo, K. S., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O. C., & Veiga, S. S. (2008). Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnology Advances*, *26*(3), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.003>
- Shen, C.-H. (2019). Chapter 8—Quantification and Analysis of Proteins. Em C.-H. Shen (Org.), *Diagnostic Molecular Biology* (p. 187–214). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0>
- Shioya, T. (2007). A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models. *The Journal of Physiological Sciences*, *57*(6), 327–335.  
<https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP010107>

- Si, Z., Wang, X., Sun, C., Kang, Y., Xu, J., Wang, X., & Hui, Y. (2019). Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *114*, 108765. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108765>
- Siegel, A., & M. Walton, R. (2020). Hematology and Biochemistry of Small Mammals. *Ferrets, Rabbits, and Rodents*, 569–582. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48435-0.00039-3>
- Silveira, A. L., & Souza, M. N. A. D. (2017). Synanthropic occurrence of the brown-spider *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) in mountainous areas of Minas Gerais State, Brazil, with notes on loxoscelism. *Revista Médica de Minas Gerais*, *27*. <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20170053>
- Sipido, K. R., Acsai, K., Antoons, G., Bito, V., & Macquaide, N. (2013). T-tubule remodelling and ryanodine receptor organization modulate sodium-calcium exchange. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *961*, 375–383. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6\\_32](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6_32)
- Sipos, F., & Múzes, G. (2021a). Controversies in therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived secretome. *BIOCELL*, *46*(4), 903–906. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.018200>
- Sipos, F., & Múzes, G. (2021b). Controversies in therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived secretome. *BIOCELL*, *46*(4), 903–906. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.018200>
- Sliding Filament Theory, Sarcomere, Muscle Contraction, Myosin | Learn Science at Scitable.* (s. d.). Recuperado 14 de junho de 2025, de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-sliding-filament-theory-of-muscle-contraction-14567666/>

- Song, Y., Du, H., Dai, C., Zhang, L., Li, S., Hunter, D. J., Lu, L., & Bao, C. (2018). Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: A pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regenerative Medicine*, *13*(3), 295–307. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0152>
- Song, Z., Ko, C. Y., Nivala, M., Weiss, J. N., & Qu, Z. (2015). Calcium-Voltage Coupling in the Genesis of Early and Delayed Afterdepolarizations in Cardiac Myocytes. *Biophysical Journal*, *108*(8), 1908–1921. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.011>
- Soni, R., Sharma, D., & Bhatt, T. K. (2016). Plasmodium falciparum Secretome in Erythrocyte and Beyond. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 194. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00194>
- Squire, J. (2019). Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22), 5715. <https://doi.org/10.3390/ijms20225715>
- Stockham, S. L., & Scott, M. A. (2008). *Fundamentals of veterinary clinical pathology* (2nd ed). Blackwell publ.
- Stoecker, W. V., Green, J. A., & Gomez, H. F. (2006). Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *55*(5), 888–890. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.04.065>
- Subba, D. D. P., & Kumar, D. S. (2024). Factors Affecting Haemoglobin Levels in Diverse Populations: An In-depth Analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.13122695>
- Sun, D. Z., Abelson, B., Babbar, P., & Damaser, M. S. (2019). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for regenerative urology. *Nature Reviews. Urology*, *16*(6), 363–375. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0169-3>

- Swanson, D. L., & Vetter, R. S. (2006). Loxoscelism. *Clinics in Dermatology*, 24(3), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2005.11.006>
- Tambourgi, D. V., Gonçalves-de-Andrade, R. M., & van den Berg, C. W. (2010). Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon*, 56(7), 1113–1119. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.021>
- Tambourgi, D. V., Magnoli, F. C., Van Den Berg, C. W., Morgan, B. P., De Araujo, P. S., Alves, E. W., & Da Silva, W. D. (1998). Sphingomyelinases in the Venom of the Spider *Loxosceles intermedia* Are Responsible for both Dermonecrosis and Complement-Dependent Hemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(1), 366–373. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9474>
- Tambourgi, D. V., Paixão-Cavalcante, D., Gonçalves De Andrade, R. M., Fernandes-Pedrosa, M. D. F., Magnoli, F. C., Paul Morgan, B., & Van Den Berg, C. W. (2005). *Loxosceles* Sphingomyelinase Induces Complement-Dependent Dermonecrosis, Neutrophil Infiltration, and Endogenous Gelatinase Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(4), 725–731. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23654.x>
- Tavares, F. L., Sousa-e-Silva, M. C. C., Santoro, M. L., Barbaro, K. C., Rebecchi, I. M. M., & Sano-Martins, I. S. (2004a). Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Human & Experimental Toxicology*, 23(10), 477–486. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht475oa>
- Tavares, F. L., Sousa-e-Silva, M. C. C., Santoro, M. L., Barbaro, K. C., Rebecchi, I. M. M., & Sano-Martins, I. S. (2004b). Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Human & Experimental Toxicology*, 23(10), 477–486. <https://doi.org/10.1191/0960327104ht475oa>

- Taylor, D. K., & Lee, V. K. (2012). Chapter 25—Guinea Pigs as Experimental Models. Em M. A. Suckow, K. A. Stevens, & R. P. Wilson (Org.), *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (p. 705–744). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00025-0>
- ten Sande, J. N., Smit, N. W., Parvizi, M., van Amersfoorth, S. C. M., Plantinga, J. A., van Dessel, P. F. H. M., de Bakker, J. M. T., Harmsen, M. C., & Coronel, R. (2017). Differential Mechanisms of Myocardial Conduction Slowing by Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Derived from Different Species. *STEM CELLS Translational Medicine*, 6(1), 22–30. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0415>
- Timmers, L., Lim, S. K., Arslan, F., Armstrong, J. S., Hoefler, I. E., Doevendans, P. A., Piek, J. J., El Oakley, R. M., Choo, A., Lee, C. N., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. V. (2007). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research*, 1(2), 129–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2008.02.002>
- Toman, O., Hnatkova, K., Smetana, P., Huster, K. M., Šišáková, M., Barthel, P., Novotný, T., Schmidt, G., & Malik, M. (2020). Physiologic heart rate dependency of the PQ interval and its sex differences. *Scientific Reports*, 10, 2551.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59480-8>
- Trevor, L. V., Riches-Suman, K., Mahajan, A. L., & Thornton, M. J. (2020a). Adipose Tissue: A Source of Stem Cells with Potential for Regenerative Therapies for Wound Healing. *Journal of Clinical Medicine*, 9(7), 2161. <https://doi.org/10.3390/jcm9072161>
- Trevor, L. V., Riches-Suman, K., Mahajan, A. L., & Thornton, M. J. (2020b). Adipose Tissue: A Source of Stem Cells with Potential for Regenerative Therapies for Wound Healing. *Journal of Clinical Medicine*, 9(7), 2161. <https://doi.org/10.3390/jcm9072161>

- Tse, G. (2016). Mechanisms of cardiac arrhythmias. *Journal of Arrhythmia*, 32(2), 75–81.  
<https://doi.org/10.1016/j.joa.2015.11.003>
- Tse, G., Chan, Y. W. F., Keung, W., & Yan, B. P. (2017). Electrophysiological mechanisms of long and short QT syndromes. *IJC Heart & Vasculature*, 14, 8–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2016.11.006>
- Tyler, R. D., & Cowell, R. L. (1996). Classification and diagnosis of anaemia. *Comparative Haematology International*, 6(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/BF00368096>
- Valentini, F., Anselmi, F., Metra, M., Cavigli, L., Giacomini, E., Focardi, M., Cameli, M., Mondillo, S., & D'Ascenzi, F. (2022). Diagnostic and prognostic value of low QRS voltages in cardiomyopathies: Old but gold. *European Journal of Preventive Cardiology*, 29(8), 1177–1187. <https://doi.org/10.1093/eurjpc/zwaa027>
- Varró, A., Tomek, J., Nagy, N., Virág, L., Passini, E., Rodriguez, B., & Baczkó, I. (2021). Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: Cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiological Reviews*, 101(3), 1083–1176.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2019>
- Vetter, R. S. (2013). Spider Envenomation in North America. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 25(2), 205–223. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2013.02.006>
- Vij, R., Stebbings, K. A., Kim, H., Park, H., & Chang, D. (2022). Safety and efficacy of autologous, adipose-derived mesenchymal stem cells in patients with rheumatoid arthritis: A phase I/IIa, open-label, non-randomized pilot trial. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02763-w>
- Vizoso, F. J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1852.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18091852>

- Wang, Q., & Michalak, M. (2020). Calsequestrin. Structure, function, and evolution. *Cell Calcium*, *90*, 102242. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102242>
- Wang, Q., Pan, S., Liu, F., Yang, D., & Wang, J. (2018). Extreme Right Axis Deviation in Acute Myocardial Infarction: A Hazardous Signal of Poor Prognosis. *The American Journal of Case Reports*, *19*, 553–556. <https://doi.org/10.12659/AJCR.908486>
- Wang, S., Qu, X., & Zhao, R. C. (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, *5*, 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-19>
- Weiss, J. N., Garfinkel, A., Karagueuzian, H. S., Chen, P.-S., & Qu, Z. (2010). Early Afterdepolarizations and Cardiac Arrhythmias. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, *7*(12), 1891–1899. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2010.09.017>
- Williams, D. P., Koenig, J., Carnevali, L., Sgoifo, A., Jarczok, M. N., Sternberg, E. M., & Thayer, J. F. (2019). Heart rate variability and inflammation: A meta-analysis of human studies. *Brain, Behavior, and Immunity*, *80*, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.03.009>
- Wright, R. P., Elgert, K. D., Campbell, B. J., & Barrett, J. T. (1973). Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *159*(1), 415–426. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90469-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90469-4)
- Xu, P., & Yang, X. (2019). The Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Spinal Cord Injury Patients: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Cell Transplantation*, *28*(1), 36–46. <https://doi.org/10.1177/0963689718808471>

- Xue, J., Zeng, W., Han, Y., John, S., Ottolia, M., & Jiang, Y. (2023). Structural mechanisms of the human cardiac sodium-calcium exchanger NCX1. *Nature Communications*, *14*(1), 6181. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41885-4>
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>
- Yang, C.-F., & Tsai, W.-C. (2022). Calmodulin: The switch button of calcium signaling. *Tzu Chi Medical Journal*, *34*(1), 15–22. [https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj\\_285\\_20](https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_285_20)
- Yasuda, M., Uchida, R., Kamai, Y., Morita, H., Tanaka, M., Ishida, T., Mochizuki, M., Yamamoto, M., Hayashimoto, N., & Kawai, K. (2022). Interstitial pneumonia in immunocompetent laboratory rats caused by natural infection with *Pneumocystis carinii*. *Experimental Animals*, *71*(1), 53–59. <https://doi.org/10.1538/expanim.21-0091>
- Yavorkovsky, L. L. (2021). Mean corpuscular volume, hematocrit and polycythemia. *Hematology*, *26*(1), 881–884. <https://doi.org/10.1080/16078454.2021.1994173>
- Yu, Y., Wen, S., Ruan, Y., Liu, N., Hu, S., Duan, X., & Bai, R. (2022). Impact of Heart Rate and Rhythm on Corrected QT Interval During Paroxysmal Atrial Fibrillation. *American Journal of Cardiology*, *168*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2021.12.016>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zhihao, L., Jingyu, N., Lan, L., Michael, S., Rui, G., Xiyun, B., Xiaozhi, L., & Guanwei, F. (2020). SERCA2a: A key protein in the Ca<sup>2+</sup> cycle of the heart failure. *Heart Failure Reviews*, *25*(3), 523–535. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09873-3>

Zimmerman, K., Moore, D. M., & Smith, S. A. (2015). Hematological Assessment in Pet Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2014.09.002>

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>

**ANEXO – Protocolo do CEUA 131/2020****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****COMPROVANTE**

Comprovamos o recebimento da solicitação de uso de animais para o projeto intitulado "Efeitos terapêuticos dos produtos gerados pelas células tronco mesenquimais no loxoscelismo", protocolo do CEUA: 131/2020 sob a responsabilidade de Marília Martins Melo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino).

Belo Horizonte, 21/06/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)