

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

**ALTERAÇÕES CLÍNICAS, LABORATORIAIS E HISTOPATOLÓGICAS (LOCAIS E
SISTÊMICAS) CAUSADAS PELO VENENO DA ARANHA *Loxosceles intermedia*
EM COBAIAS (*Cavia porcellus*)**

PAULA BRETAS ULLMANN FERNANDES

Belo Horizonte – Minas Gerais
Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

2023

PAULA BRETAS ULLMANN FERNANDES

ALTERAÇÕES CLÍNICAS, LABORATORIAIS E HISTOPATOLÓGICAS (LOCAIS E SISTÊMICAS) CAUSADAS PELO VENENO DA ARANHA *Loxosceles intermedia* EM COBAIAS (*Cavia porcellus*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Marília Martins Melo

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

2023

F363a

Fernandes, Paula Bretas Ullmann, 1996-
Alterações clínicas, laboratoriais e histopatológicas (locais e sistêmicas) causadas pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias (*cavia porcellus*) / Paula Bretas Ullmann Fernandes. – 2023.

192f.

Orientadora: Marília Martins Melo
Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.
Bibliografias: f. 171 a 192.

1. Aranha marrom – Veneno - Teses – I. Melo, Marília Martins – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089 7

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos Santos CRB 3589
Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - PAULA BRETAS ULLMANN FERNANDES

Às 09:00 horas do dia 15 de setembro de 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

Alterações clínicas, laboratoriais e histopatológicas (locais e sistêmicas) causadas pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias (*Cavia porcellus*)

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgias Veterinárias**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Marília Martins Melo**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Marília Martins Melo	X	
Roberto Baracat de Araújo	X	
Clara Guerra Duarte	X	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 15 de setembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Marília Martins Melo, Professora do Magistério Superior**, em 15/09/2023, às 21:32, 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 **Roberto Baracat de Araujo, Chefe de departamento**, em 19/09/2023, às 08:38, 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 19/09/2023, às 09:32, 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=0, informando o código verificador **2607758** e o código CRC **FD6B80EB**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA BRETAS ULLMANN FERNANDES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgias Veterinárias.

Aprovado(a) em 15 de setembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

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

Dr.(a). Roberto Baracat de Araújo

Dr.(a). Clara Guerra Duarte



Documento assinado eletronicamente por **Marília Martins Melo, Professora do Magistério Superior**, em 15/09/2023, às 21:32, 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 **Roberto Baracat de Araújo, Chefe de departamento**, em 19/09/2023, às 08:39, 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 19/09/2023, às 09:32, 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=0, informando o código verificador **2607769** e o código CRC **BA019F5C**.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Flávia e Fernando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida, pelas oportunidades e por me mostrar que eu sempre posso fazer muito mais do que eu imagino.

À minha família amada, em especial meus pais, Flávia e Fernando, e minha irmã, Marina por todo apoio, amor, exemplo e torcida. Por cada ato de cuidado para tornar todo esse processo mais fácil. Em tudo que eu conquistei até agora e irei conquistar no futuro, o mérito também é de vocês, sempre.

À Querida Professora Marília, muito mais que uma orientadora. Muito obrigada por toda a confiança, ensinamentos, apoio e paciência. Por ser inspiração e compartilhar comigo tanta sabedoria o tempo todo. Te admiro muito e tenho muito orgulho de ser sua orientada.

Às Toxicats Raquel, Anna Paula e Gabrielly, e também ao Matheus e Dennis, por toda o suporte, trabalho, cuidado e dedicação ao projeto de pesquisa. Ao Lucas, também pela parceria e apoio. Eu não teria conseguido sem vocês. Vocês são feras.

Eterna gratidão e respeito aos animais utilizados neste experimento, pela contribuição à ciência e aos futuros projetos que visarão solucionar as sequelas causadas pelos acidentes com aranhas marrom, possivelmente ajudando e até mesmo salvando muitas pessoas e animais.

Muito obrigada aos colegas da Santo Agostinho Hospital Veterinário, em especial ao Dr. Vitor Márcio Ribeiro, Dr. Marthin Raboch Lempek, Dra. Luciene Both e Dra. Fernanda Lopes, pela valiosa contribuição ao experimento.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, por me proporcionar a realização de tantos sonhos: me formar Médica Veterinária, a realização do mestrado, por poder trabalhar com ciência, que tanto amo e por ter conhecido tantas pessoas incríveis durante essa trajetória.

Aos meus amigos do coração, pela amizade, amor, por compreenderem as minhas ausências e torcerem por mim e pelos meus sonhos como se fossem deles.

À Maluzinha, você é luz e alegria na minha vida. Escrever escutando seus ronquinhos do meu lado tornou tudo mais leve e mais fofinho.

E por fim, agradeço à CAPES, pela bolsa concedida.

Todos vocês são os “gigantes” que me permitiram enxergar além! Muito Obrigada!

"Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

RESUMO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas popularmente por aranhas-marrons, são responsáveis pela maioria dos casos notificados de acidentes provocados por aracnídeos. Seu veneno possui uma composição proteica complexa, sendo as fosfolipases D a sua principal toxina. O quadro clínico inclui desde a evolução de lesões dermonecroticas até manifestações sistêmicas, que são pouco estudadas. Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações sistêmicas e locais causadas após administração intradérmica de diferentes concentrações de veneno de *Loxosceles intermedia* em cobaias (*Cavia porcellus*) durante 72 horas. Foram utilizados 18 animais machos, adultos, sendo que 16 animais receberam doses entre 11,627 a 350 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* e dois receberam placebo, atuando como animais controle. As cobaias foram avaliadas clinicamente, após o envenenamento, por meio de exames hematológicos e perfil sanguíneo bioquímico, exames de urina (urinálise e perfil eletroforético) e eletrocardiograma. Após 72 horas do envenenamento (óbito/eutanásia), foi realizada a necropsia e coleta de amostras para análises histopatológicas. As cobaias apresentaram um quadro clínico de loxoscelismo víscero-cutâneo, com o aparecimento de discretas lesões dermonecroticas, bem como alterações hematológicas (anemia, hemólise, neutrofilia e trombocitopenia); renais (azotemia, aumento dos níveis séricos de SDMA, hiperfosfatemia e alterações histopatológicas); urinárias (proteinúria, com presença de proteínas de baixo e alto peso molecular, aumento da relação ureia:creatinina urinária e aumento dos níveis de GGT urinária); cardiovasculares (alterações eletrocardiográficas, aumento dos níveis séricos de CK e sua fração MB, bem como de Troponina I e LDH); hepáticas (alterações histopatológicas, como necrose e hepatite) e no sistema nervoso central (encefalite identificada no exame histopatológico). Dessa forma, foi possível concluir que o veneno de *L. intermedia* causa quadro clínico sistêmico severo em cobaias, fazendo com que este animal possa ser considerado um bom modelo experimental, principalmente para o loxoscelismo sistêmico.

Palavras chaves: *Loxosceles*, dermonecrose, loxoscelismo sistêmico, *Cavia porcellus*.

ABSTRACT

Spiders of the genus *Loxosceles*, popularly known as brown spiders, are responsible for most reported cases of accidents caused by arachnids. Its venom has a complex protein composition, with phospholipases D being its main toxin. The clinical picture ranges from the evolution of dermonecrotic lesions to systemic manifestations, which are little studied. Given this context, the present study aimed to evaluate the systemic and local changes caused after intradermal administration of different concentrations of *Loxosceles intermedia* venom in guinea pigs (*Cavia porcellus*) for 72 hours. Eighteen adult male animals were used, with 16 animals receiving doses ranging from 11,627 to 350 µg of *L. intermedia* venom and two receiving a placebo, control animals. The guinea pigs were clinically evaluated, after envenomation, by means of complete blood count and biochemical blood profile, urine tests (urinalysis and electrophoretic profile) and electrocardiogram. After 72 hours of envenoming (death/euthanasia), necropsy was performed and samples were collected for histopathological analysis. The guinea pigs showed symptoms of viscerocutaneous loxoscelism, with the appearance of discrete dermonecrotic lesions, as well as hematological alterations (anemia, hemolysis, neutrophilia and thrombocytopenia); renal (azotemia, increased serum levels of SDMA, hyperphosphatemia and histopathological alterations) and urinary disorders (proteinuria, with the presence of low and high molecular weight proteins, increased urinary urea:creatinine ratio and increased levels of urinary GGT); cardiovascular alterations (electrocardiographic changes, increased serum levels of CK and its MB fraction, as well as of Troponin I and LDH); and histopathological lesions in the liver, such as necrosis and hepatitis, and in the central nervous system (encephalitis). Thus, it was possible to conclude that *L. intermedia* venom causes severe systemic clinical symptoms in guinea pigs, making this animal a good experimental model, especially for systemic loxoscelism.

Keywords: *Loxosceles*, dermonecrosis, systemic loxoscelism, *Cavia porcellus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Cão da raça Pastor Mallinois, macho, após acidente com aranha-marrom. São observadas lesões dermonecroticas, com eritema e escaras (Arquivo pessoal). Página 51
- Figura 2** Cão da raça Pastor Mallinois macho, após acidente com aranha-marrom e desbridamento cirúrgico (Arquivo pessoal). Página 52
- Figura 3** Cobaias nas gaiolas de experimentação no biotério do Laboratório Multiusuário da Escola de Veterinária da UFMG (Arquivo pessoal). Página 57
- Figura 4** Concentração total de proteína da amostra de veneno de *Loxosceles intermedia* realizada pelo método de Lowry. Página 58
- Figura 5** Posicionamento dos eletrodos do eletrocardiograma em cobaia (Arquivo pessoal). Página 64
- Figura 6** Alterações locais (eritema e halo hemorrágico após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia* em cobaias. **1:** Cobaia 1; **2:** Cobaia 2; **3:** Cobaia 3; **4:** Cobaia 4; **5.1:** Cobaia 5, 24 horas após o envenenamento; **5. 2:** Cobaia 5, 72 horas após o envenenamento, apresentando melhora da lesão. **6:** Cobaia 6; **7:** Cobaia 7; **8:** Cobaia 8; **9:** Cobaia 9; Cobaia; **10:** Cobaia 10; **11:** Cobaia 11; **12:** Cobaia 12; **13:** Cobaia 13; **14:** Cobaia 14; **15:** Cobaia 15; **16:** Cobaia 16; **17:** Controle 1. Página 72-74
- Figura 7** Número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após aplicação intradérmica experimental de veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo Página 75

de referência (4,5 – 6,4 x10⁶/μL de sangue) (entre as linhas roxas).

- Figura 8** Valores de hemoglobina (g/dL), 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após aplicação intradérmica experimental de veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (11,6-16,9 g/dL) (entre as linhas roxas). Página 77
- Figura 9** Valores de Volume Globular (%) 24, horas (em laranja) e 72 horas (em azul) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (39-55%) (entre as linhas roxas). Página 78
- Figura 10** Valores de CHCM (g/dL), 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (29-32 g/dL) (entre as linhas roxas). Página 79
- Figura 11** Número de leucócitos/μL de sangue, 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (2.900 – 14.100 leucócitos/μL de sangue) (entre as linhas roxas). Página 81
- Figura 12** **A:** Valores relativos de leucócitos (%) entre 24 horas e 72 horas após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias. **B:** Valores absolutos de leucócitos/μL entre 24 e 72 horas após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias. Página 83
- Figura 13** Número de plaquetas/μL de sangue, as 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação Página 85

do intervalo de referência (250.000 a 850.000 plaquetas/ μ L) (entre as linhas roxas).

- Figura 14** Biodistribuição de veneno de *Loxosceles intermedia* em pulmões, coração, rins e fígado, determinado por ELISA, em ratos após a injeção de dose única de 2,5 μ g de veneno. Fonte: Dias-Lopes *et al.*, (2010). Página 91
- Figura 15** Concentração de proteínas (+) da urina nos animais inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia* (em azul), juntamente à sua linha de tendência (pontilhada), e a concentração de proteínas (+) da urina nos animais tratados com solução fisiológica 0,9% (em vermelho), ao longo dos tempos 1 hora, 24 horas, 48 horas e 72 horas. Página 107
- Figura 16** Relação proteína: creatinina urinária (RP/C) da urina nos animais inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia* e com solução fisiológica 0,9% (controle), ao longo dos tempos 1 hora (T1), 12 horas (T12), 48 horas (T48) e 72 horas (T72). Página 108
- Figura 17** Concentração de GGT urinária (UI/L) nos animais inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia* e com solução fisiológica 0,9% (controle), ao longo dos tempos 1 hora (T1), 12 horas (T12), 48 horas (T48) e 72 horas (T72). Página 109
- Figura 18** Relação GGT:creatinina urinária nos animais inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia* e com solução fisiológica 0,9% (controle), ao longo dos tempos 1 hora (T1), 12 horas (T12), 48 horas (T48) e 72 horas (T72). Página 110
- Figura 19** Cristais identificados na urina das cobaias. A: Cristais de Fosfato de Cálcio (seta azul) e Cristais de Carbonato de Cálcio em forma de roseta (seta vermelha). B: Cristais de FAM (seta preta). C: Cristais de oxalato de cálcio di-hidratado (Seta verde). D: Página 111

Oxalato de cálcio mono-hidratado (Seta amarela).
Fonte: Arquivo Pessoal

- Figura 20** SDS-PAGE do veneno de *Loxosceles intermedia* utilizado neste experimento. Nota-se a demarcação de bandas, com destaque para a faixa demarcada aproximadamente na faixa entre 25-35 kDa. Página 113
- Figura 21** SDS-PAGE das urinas do animal controle (C1), coletadas em T1, T12, T24, T48 e T72. C1/T1: Nota-se a demarcação das bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular, entre 25-20 kDa. C1/T12 e C1/T24: Manutenção da demarcação das bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular. C1/T48: Demarcação das bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular, entre 25-20 kDa e de bandas referentes as proteínas de alto peso molecular, entre 60 - 75 kDa. C1/T72: Sem alterações em relação ao observado em 48 horas. Página 117
- Figura 22** SDS-PAGE das urinas do animal controle (C2), coletadas em T1, T12, T24. **C2/T1**: Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **C2/T12**: Nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 25 kDa. **C2/T48**: sem alterações em relação à T12. Página 118
- Figura 23** SDS-PAGE das urinas do animal 1 (11,627 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. 1/T1: Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. 1/T24: Após 24 horas, nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-35, 45-35 e 25-20 kDa, e proteínas de alto peso molecular, entre 75-60, 140-100 e 245-180 kDa. Há aumento de concentração expressiva de proteínas de peso molecular próximo à 60 kDa. 1/T48 e 1/72: Após 48 horas não foram Página 119

observadas alterações significativas em relação a T24.

- Figura 24** SDS-PAGE das urinas do animal 2 (12,789 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. 2/T1: Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. 2/T24: Após 24 horas, nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-45, 45-35, 35-25 e 25-20 kDa, e proteínas de alto peso molecular, entre 75-60 e 140-100 kDa. 2/T48: Após 48 horas, houve aumento na proteinúria observada em relação à T24. 2/T72: Após 72 horas, houve diminuição da concentração proteica, porém a demarcação de proteínas de alto e baixo peso molecular se manteve. Página 120
- Figura 25** SDS-PAGE das urinas do animal 3 (14,068 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. 3/T1: Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. 3/T24: Após 24 horas, nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-45, 45-35 e 25-20 kDa, e proteínas de alto peso molecular, entre 140-100 kDa. Há aumento de concentração expressiva de proteínas, porém, com destaque entre 60-45 kDa. 3/T48: Após 48 horas, manutenção da presença de proteínas, em relação à 24 horas. 3/T72: Após 72 horas, não foi mais observada a presença de proteínas demarcadas entre 140-100 kDa. Página 121
- Figura 26** SDS-PAGE das urinas do animal 4 (15,475 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. 4/T1: Observa-se discreta presença de proteínas de peso molecular de aproximadamente 60 kDa. 4/T24: Após 24 horas, nota-se demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-45, 45-35, 35-25 e 25-20 kDa e discreta demarcação entre 25-20 kDa, e considerável demarcação de proteínas de alto peso molecular, entre 250-60 kDa. 4/T48: Após 48 horas, Página 122

observa-se diminuição da concentração proteica, porém, mantendo-se as mesmas demarcações de peso molecular em relação a T24. 4/T72: Após 72 horas, a presença de proteínas de alto peso molecular manteve-se, porém, não foram mais observadas proteínas de baixo peso molecular abaixo de 35 Kda.

Figura 27 SDS-PAGE das urinas do animal 5 (17,795 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. 5/T1: Nota-se discreta demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular de aproximadamente 60 kDa. 5/T24: Após 24 horas, proteinúria considerável, com destaque para a faixa entre 60-45 kDa. Nota-se presença de proteínas de alto peso molecular, entre 245-180, 140-100 e 75-60 kDa e proteínas de baixo peso molecular, entre 60-45, 35-25, 25-20 e abaixo de 20 kDa. 5/T48: Após 48 horas, observa-se diminuição da concentração proteica. Não é observada a presença de proteínas de baixo peso molecular entre 35-25 kDa. 5/T72: Após 72 horas, não foram observadas alterações significativas em relação à T48. Página 123

Figura 28 SDS-PAGE das urinas do animal 6 (18,725 µg), coletadas em T1, T12, T48 e T72. **6/T1**: Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **6/T12**: Nota-se discreta demarcação de proteínas de alto peso molecular entre as bandas 245-180 e 140-100 kDa, porém, grande concentração proteica destacada entre as bandas 60-45 kDa. **6/T48**: Após 48 horas, observa-se diminuição da concentração proteica, porém, mantendo-se as mesmas demarcações de peso molecular em relação a T24. **6/T72**: Após 72 horas, houve aumento na proteinúria, com destaque para proteínas de alto peso molecular, entre 245-180, 140-100 e 75-60 kDa, mantendo-se a principal concentração proteica entre 60-45 kDa e apresentando demarcação de banda entre 25-20 kDa. Página 124

Figura 29 SDS-PAGE das urinas do animal 7 (21,533 µg), coletadas em T1 e T24. 7/T1: Nota-se discreta Página 125

demarcação entre as bandas 60-45 kDa. 7/T24: Após 24 horas, observa-se aumento da concentração proteica na urina, destacando-se a banda 60-45 kDa.

- Figura 30** SDS-PAGE das urinas do animal 8 (24,762 µg), coletadas em T1 e T24. 8/T1: Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. 8/T12: Após 24 horas, observa-se a presença de concentração proteica na urina, destacando-se a banda 75-60 kDa. Página 126
- Figura 31** SDS-PAGE das urinas do animal 10 (29,995 µg), coletadas em T1, T2 e T24. 10/T1: Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. 10/T2: Não foram observadas alterações em relação à T1. 10/T24: Após 24 horas, aumento generalizado da concentração de proteínas de 245-20 kDa, principalmente de alto peso molecular. Página 127
- Figura 32** SDS-PAGE das urinas do animal 11 (47,985 µg), coletadas em T1 e T24. 11/T1: Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. 11/T24: Após 24 horas, aumento da concentração de proteínas entre 60-45 kDa e presença de proteínas de alto e baixo peso molecular, entre 75-20 kDa. Página 128
- Figura 33** SDS-PAGE das urinas do animal 12 (76,775 µg), coletadas em T1, T12 e T24. 12/T1: Nota-se discreta demarcação de bandas referentes a proteínas de peso molecular de aproximadamente 60 kDa. 12/T12: Não foram observadas alterações em relação à T1. 12/T24: Após 24 horas, aumento generalizado da concentração de proteínas de alto e baixo peso molecular entre 245-20 kDa. Página 129
- Figura 34** SDS-PAGE das urinas do animal 13 (105 µg), coletadas em T1 e T12. 13/T1: Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. 13/T12: Aumento da proteinúria demarcada entre 60-45 kDa. Página 130

13/T24: Presença considerável de proteínas de alto e baixo peso molecular, com destaque para a faixa entre 60-45 kDa.

- Figura 35** SDS-PAGE das urinas do animal 14 (140 µg), coletadas em T12 e T24. 14/T12: Presença de proteínas de baixo peso molecular entre 60-20 kDa, com destaque para a faixa demarcada entre 60-45 kDa. 14/T24: Observa-se um aumento considerável da proteinúria, com a presença de proteínas de alto e baixo peso molecular, entre 245-20 kDa. O destaque manteve-se entre 60-45 kDa. Página 131
- Figura 36** SDS-PAGE das urinas do animal 15 (210 µg), coletadas em T1, T12, T24 e TF. 15/T1: Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. 15/T12: Aumento da concentração de proteinúria de baixo peso molecular, com destaque na concentração de proteínas na banda 60-45 kDa. Nota-se também proteínas entre 45-35 e 25-20 kDa. 15/T24: Observa-se a presença de proteínas de alto peso molecular. Porém, devido à densidade proteica da urina, durante o preparo da amostra para a eletroforese, essa se solidificou, o que pode resultar em interferência dos resultados. Página 132
- Figura 37** SDS-PAGE das urinas do animal 16 (350 µg), coletadas em T12, T24. 16/T12: Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. 16/T24: Aumento expressivo da concentração de proteinúria de alto e baixo peso molecular entre 245-20 kDa. Com destaque para a faixa entre 60-45 kDa. Página 133
- Figura 38** Traçado eletrocardiográfico evidenciando o ritmo sinusal de cobaia no tempo zero. Derivação D2, 50 mm/s, N. Página 135
- Figura 39** Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*. Derivação D2, 50 Página 138

mm/s, N. Nota-se a ocorrência de batimento juncional, circulada em preto.

- Figura 40** Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de extrassístole atrial isolada, circulada em preto. Página 138
- Figura 41** Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de extrassístole ventricular isolada, circulada em preto, com provável origem em ventrículo direito. Página 138
- Figura 42** Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de extrassístoles ventriculares em par, circuladas em preto, com provável origem em ventrículo esquerdo. Página 138
- Figura 43** Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de batimentos juncionais, circulados em preto, e dissociação atrioventricular, circulada em vermelho. Página 139
- Figura 44** Corte sagital de rins de cobaias após aplicação intradérmica de soro fisiológico 0,9% / veneno de *L. intermedia*. **A:** Visão macroscópica renal de animal controle. Não foram observadas alterações dignas de nota. **B:** Visão macroscópica renal do animal 15 (210 µg). Órgão aumentado de volume e vermelho-escuro (congestão). Perda de definição córtico-medular. **C:** Visão macroscópica renal de animal 2 (12,789 µg). Observa-se diminuição da definição córtico-medular. Página 140

- Figura 45** Coração de cobaias após aplicação intradérmica de soro fisiológico 0,9% / veneno de *L. intermedia*. **A:** Visão macroscópica cardíaca do animal 15 (210 µg). Órgão aumentado de volume e vermelho-escuro (congestão); notam-se focos de hemorragia. **B:** Visão macroscópica cardíaca do animal 8 (24,762 µg). Observa-se aumento de volume do órgão, que apresenta superfície espessa, com aspecto gelatinoso e brilhante, sugestivo de edema generalizado e congestão. **C:** Visão macroscópica cardíaca de animal controle. Não foram observadas alterações dignas de nota. Página 141
- Figura 46** Fígado de cobaias após aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. **A:** Visão macroscópica hepática do animal 9 (28,477 µg). Não foram observadas alterações dignas de nota. **B:** Visão macroscópica hepática do animal 2 (12,789 µg). Observam-se áreas arredondadas multifocais brancacentas, sugestivas de necrose hepática. Página 141
- Figura 47** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 12,789 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 2), após coloração HE. **A:** Aumento 200x. Dilatação de túbulos distais e proximais devido à acúmulo de material amorfo eosinofílico (sugestivo de proteína), multifocal moderada (demarcados por círculo vermelho). **B:** Aumento 200x. Hemorragia cortical e medular multifocal discreta (circulada em amarelo). Página 142
- Figura 48** Fotomicroscopias de rim de cobaias inoculadas com 17,795 e 18,725 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animais 5 e 6), após coloração HE. Observa-se degeneração e necrose glomerular associada a degeneração e congestão corticomedular difusa acentuada e proteinúria difusa acentuada. Dilatação do espaço urinário com acúmulo de material amorfo eosinofílico (sugestivo de proteína). Vacuolização de túbulo proximal associada a acúmulo de material amorfo eosinofílico. **A:** aumento 200x. **B:** aumento 100x. Página 143

- Figura 49** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 21,533 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 7), após coloração HE. **A:** Aumento 100x. Observa-se degeneração e necrose glomerular (em vermelho) associada a degeneração e congestão corticomedular e proteinúria difusa acentuada. Acentuada dilatação do espaço urinário, com acúmulo de material amorfo eosinofílico multifocal acentuado (proteína). **B:** Aumento 200x. Vacuolização de túbulo proximal associada a acúmulo de material amorfo eosinofílico (circuladas em amarelo). Página 143
- Figura 50** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 24,762 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE. Nota-se degeneração moderada de túbulo proximal associada a acentuada congestão glomerular e cortical multifocal acentuada. **A:** Aumento 100x. Vacuolização de túbulo proximal multifocal moderada. **B:** Aumento 200x. Congestão glomerular e cortical multifocal acentuada, com vacuolização glomerular. Página 144
- Figura 51** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 28,477 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 9), após coloração HE. Degeneração vacuolar de túbulo proximal multifocal moderada (em vermelho). Espessamento mesangial multifocal discreto (glomerulite membranosa), aderência glomerular a cápsula, multifocal discreto (demarcada em azul). Vacuolização de endotélio de túbulo proximal multifocal moderada. **A:** aumento 100x **B:** aumento 200x. Página 144
- Figura 52** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 29,995 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 10), após coloração HE. **A:** Aumento 200x. Vacuolização de túbulo proximal multifocal discreta (demarcada em azul). **B:** Aumento 40x. Hiperemia multifocal moderada (circulada em amarelo); **C:** Aumento 100x. Degeneração de túbulo proximal e presença de cilindros hialinos multifocal moderado Página 145

(setas pretas). **D:** Aumento 200x. Túbulos distais apresentando restos de hemácias no lúmen associadas à material amorfo eosinofílico multifocal moderado.

- Figura 53** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 47,985 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 11), após coloração HE. Degeneração e dilatação do espaço urinário (círculos vermelhos) com formação de cilindros hialinos (setas azuis) multifocal moderada. Vacuolização de túbulos proximais multifocal discreta. **A:** aumento 100x. **B:** aumento 200x. Página 146
- Figura 54** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 76,775 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 12), após coloração HE. Observa-se degeneração e dilatação do espaço urinário com formação de cilindros hialinos difuso acentuado (setas azuis). Acentuado acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman, túbulos proximais e distais (demarcados em vermelho), com dilatação e vacuolização de túbulos proximais e espaço urinário (demarcados em preto). **A:** aumento 100x. **B:** aumento 200x. Página 146
- Figura 55** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 105 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 13), após coloração HE. Discreta degeneração de túbulos proximal e distal com formação de cilindros hialinos (setas pretas) e hiperemia multifocal acentuada (círculos vermelhos). **A:** aumento 40x. **B:** aumento 100x. Página 147
- Figura 56** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 140 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 14), após coloração HE. Degeneração glomerular com acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman (setas) e túbulos proximais multifocal Página 147

discreto. Hiperemia multifocal moderada. A: Aumento 100x. B: Aumento 200x.

- Figura 57** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 210 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. **A:** Aumento 200x. Hemorragia glomerular (destacado por círculo azul). **B:** Aumento 200x. Degeneração glomerular com acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman e túbulos proximais multifocal discreto (demarcado em vermelho). Página 148
- Figura 58** Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 350 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 16), após coloração HE. Degeneração glomerular com acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman e vacuolização de túbulos proximais multifocal discreto (demarcados em preto). **A:** aumento 100x. **B:** Aumento 200x. Página 148
- Figura 59** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 12,789 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 2), após coloração HE. Acentuada necrose de coagulação associada a dissociação e vacuolização de hepatócitos centrolobular, mediozonal e periportal, com presença de estruturas redondas, basofílicas, intralesionais e macrófagos hepáticos (célula de Kupffer) intralesionais. Aumento 400x. Página 150
- Figura 60** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 17,795 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 5), após coloração HE. Moderada necrose e degeneração multifocal associada à presença de estruturas basofílicas. Aumento 100x. Página 150
- Figura 61** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 18,725 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 6), após coloração HE. Moderada Página 151

degeneração por vacuolização hepática multifocal (destacada em vermelho). Aumento 400x.

- Figura 62** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 21,533 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 7), após coloração HE. Degeneração hepática multifocal moderada (circulada em preto). Aumento 100x. Página 151
- Figura 63** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 24,762 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE Congestão hepática difusa acentuada. Nota-se dilatação de capilares sinusoides em decorrência de acúmulo de hemácias intravasculares (setas). Aumento 400x. Página 152
- Figura 64** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 29,995 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 10), após coloração HE. Acentuada necrose de coagulação e degeneração hepática multifocal a coalescente associada a estruturas citoplasmáticas intralésionais (células de Kupffer). Aumento 400x. Página 152
- Figura 65** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 105 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 13), após coloração HE. Acentuada necrose de coagulação e degeneração hepática multifocal a coalescente acentuada associada a estruturas citoplasmáticas intralésionais intensamente basofílicas no citoplasma de hepatócitos e macrófagos hepáticos (células de Kupffer) (circuladas em preto). Aumento 200 x. Página 153
- Figura 66** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 140 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 14), após coloração HE. Degeneração centrolobular multifocal discreta (destacada em vermelho). Aumento 200x. Página 153

- Figura 67** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 210 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. Degeneração centrolobular multifocal moderada (em preto). Aumento 200x. Página 154
- Figura 68** Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 350 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 16), após coloração HE. Necrose focal extensa (em preto) com estruturas basofílicas intralesionais e degeneração centrolobular multifocal discreta. Aumento 40x. Página 154
- Figura 69** Fotomicroscopias de cérebro de cobaias inoculadas com 14,068 e 21,533 µg de veneno de *Loxosceles intermedia*, respectivamente, após coloração HE. Alterações histopatológicas cerebrais: **A**: Cobaia 3. Cérebro: Encefalite linfoplasmocitária e histiocítica focal discreta. Aumento 200x. **B**: Cobaia 7. Encefalite hemorrágica linfoplasmocitária e histiocítica multifocal moderada com gliose multifocal moderada. Página 155
- Figura 70** Fotomicroscopias cardíacas de cobaia inoculada com 24,762 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE. Nota-se congestão difusa acentuada. **A**: aumento 400x. **B**: Aumento 200x. Página 156
- Figura 71** Fotomicroscopias cardíacas de cobaia inoculada com 210 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. Observa-se hemorragia focalmente extensa moderada em átrio esquerdo. Página 157
- Figura 72** Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com solução fisiológica 0,9% (animal controle), após coloração HE. Não há ocorrência de lesão aparente. Aumento 40x. Página 158
- Figura 73** Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 11,627 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 1), após coloração HE. Nota-se a ocorrência Página 158

de dermatite granulomatosa multifocal discreta. Presença de células gigantes multinucleadas em derme profunda (seta). Aumento 400x.

- Figura 74** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 12,789 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 2), após coloração HE. Nota-se edema focalmente extenso acentuado (em vermelho). Aumento 40x. Página 159
- Figura 75** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 14,068 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 3), após coloração HE. Não foram observadas lesões aparentes. Aumento 40x. Página 159
- Figura 76** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 15,475 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 4), após coloração HE. **A:** Nota-se epidermite neutrofílica focalmente extensa acentuada (seta), com dissociação da camada córnea focalmente extensa acentuada com restos celulares, aparentemente neutrófilos, no interior da camada córnea. Perda de estriações e hipereosinofilia multifocal discreta em leiomiócitos. Aumento 40x. **B:** Paniculite necrotizante neutrofílica difusa acentuada. Camada adiposa com infiltrado inflamatório neutrofílico difuso acentuado (em vermelho) associado a edema e necrose multifocal moderado. Aumento 200x. Página 160
- Figura 77** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 17,795 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 5), após coloração HE. Observa-se a ocorrência de paniculite neutrofílica focal acentuada. **A:** Infiltrado inflamatório neutrofílico focal acentuado, com infiltrado neutrofílico e histiocitário difuso discreto (em vermelho). Aumento 600x. **B:** Hemorragia multifocal discreta (em preto). Aumento 200x. Página 160
- Figura 78** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 18,725 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* Página 161

(animal 6), após coloração HE. Observa-se dermatite neutrofílica focalmente extensa acentuada. **A:** Infiltrado inflamatório neutrofílico focalmente extenso acentuado em derme superficial, até derme profunda, associado a degeneração de leiomiócitos multifocal acentuada. **B:** Porção adjacente de pânículo apresentando material amorfo (edema) (em vermelho) e fibrilar (fibrina) (em azul) eosinofílico.

- Figura 79** Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 21,533 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 7), após coloração HE. Nota-se a ocorrência de paniculite fibrinosa linfohistioplasmocitária e neutrofílica multifocal a coalescente moderada. Observa-se infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário e neutrofílico multifocal a coalescente moderado associado a fibrina (circulado) e hemorragia difusa moderada. Página 161
- Figura 80** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 24,762 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE. **A:** Dermatite neutrofílica focalmente extensa moderada. Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico focalmente extenso moderado em derme profunda. Camada adiposa com infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitária mínimo. Aumento 400x. **B:** Paniculite neutrofílica e histiocitária focal discreta. Nota-se infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitário perivascular focal discreto associado à hemorragia e edema focal discreto. Aumento 200x. Página 162
- Figura 81** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 28,477 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 9), após coloração HE. **A:** Dermatite hemorrágica neutrofílica multifocal a coalescente acentuada (em preto). Nota-se hemorragia multifocal a coalescente acentuada, associada a necrose e dissociação de fibras colágenas multifocal acentuado e infiltrado inflamatório neutrofílico nas bordas da área hemorrágica, moderado, predominantemente em Página 162

derme superficial e epiderme. Aumento 40x. **B:** Dermatite profunda neutrofílica e histiocítica multifocal discreta. Há infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitário multifocal discreto. Aumento 200x.

Figura 82 Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 29,995 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 10), após coloração HE. **A:** Epidermite necrohemorrágica (em vermelho) neutrofílica (em azul) focalmente extensa acentuada. Observa-se necrose e hemorragia focalmente extensa associada a infiltrado inflamatório neutrofílico acentuados, estendendo-se até a camada superficial de derme. Aumento 100x. **B:** Dermatite e paniculite neutrofílica multifocal moderada com trombo e degeneração de leiomiócitos multifocal moderada (em preto) com trombo e degeneração de leiomiócitos multifocal moderada. Aumento 100x. Página 163

Figura 83 Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 47,985 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 11), após coloração HE. **A:** Dermatite necrotizante neutrofílica focalmente extensa acentuada, observa-se necrose focalmente extensa, da epiderme até a derme superficial, associada a hemorragia multifocal acentuada e infiltrado inflamatório neutrofílico. Aumento 400x. **B:** Dermatite neutrofílica focalmente extensiva, com degeneração de leiomiócitos e paniculite hemorrágica neutrofílica focalmente extensa acentuada e eventuais trombos. Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico focalmente extenso acentuado, que por vezes permeia a camada muscular. Camada muscular apresentando perda de estriação e hipereosinofilia multifocal discreta de leiomiócitos (em vermelho). Aumento 200x. **C:** Camada adiposa apresentando hemorragia focalmente extensa acentuada, infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal a coalescente moderado, hiperemia multifocal moderada, e eventuais trombos. Aumento 200x. **D:** Perivasculite neutrofílica focal discreta (em azul). Nota-se infiltrado Página 164

inamatório neutrofílico focal discreto perivascular em derme. Aumento 400x.

- Figura 84** Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 76,775 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 12), após coloração HE. **A:** Dermatite necrotizante neutrofílica focalmente extensa acentuada. Aumento 100x. **B:** Paniculite e perivasculite linfoplasmocitária e neutrofílica multifocal moderada com formação de trombo multifocal discreta. Observa-se necrose focalmente extensa e profunda, da epiderme até a derme profunda, com hemorragia. Na derme mais profunda, limítrofe ao tecido adiposo há infiltrado inflamatório linfoplasmocitário difuso moderado, que por vezes se estende à camada adiposa. Na camada adiposa, hemorragia multifocal moderada e congestão multifocal moderada, com infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitário e neutrofílico multifocal discreto, associado à formação de trombo multifocal discreto. Aumento 200x. Página 165
- Figura 85** Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 105 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 13), após coloração HE. Dermatite linfoplasmocitária e neutrofílica profunda difusa discreta. Nota-se infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico profundo difuso discreto, predominantemente perivascular. Aumento 100x. Página 165
- Figura 86** Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 140 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 14), após coloração HE. **A:** Dermatite neutrofílica multifocal discreta. Infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal discreto. Aumento 200 x; **B:** Paniculite fibrinohemorrágica neutrofílica multifocal acentuada. Aumento 200x. Página 166
- Figura 87** Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 210 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. Observa-se epidermite Página 166

necrotizante neutrofílica focal acentuada com dermatite e paniculite neutrofílica multifocal acentuada. **A:** Necrose focal da epiderme (destacada em preto), associada a infiltrado inflamatório neutrofílico focal acentuado, com formação de microabscessos intraepidermais. Aumento 200x. **B:** O mesmo infiltrado se estende até derme profunda, alcançando camada adiposa. Aumento 200x.

Figura 88 Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 350 μ g de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 16), após coloração HE. **A:** Dermatite fibrinohemorrágica profunda linfoplasmocitária e neutrofílica focalmente extensa moderada (em vermelho). Aumento 40x. **B:** Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico profundo focalmente extenso em derme profunda, início de panículo, moderado, associada a hemorragia e fibrina multifocal moderadas. Aumento 200x. Página 167

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Notificação de acidentes envolvendo aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> (1975-2022) no Brasil	Página 46
Quadro 2	Alterações locais e sistêmicas após injeção intradérmica de diferentes doses de veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> em cobaias.	Página 66
Quadro 3	Relações A:G e prováveis causas e patologias (adaptado de Lopes, 2007).	Página 102
Quadro 4	Proteínas demarcadas (+) no SDS-PAGE realizado com o veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> utilizado neste experimento, de acordo com a massa molecular em kDa.	Página 114
Quadro 5	Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia (controle 1) no SDS-PAGE, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).	Página 117
Quadro 6	Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia (controle 2) no SDS-PAGE, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12) e 24h (T24).	Página 118
Quadro 7	Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 11,627 µg veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> , de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).	Página 119
Quadro 8	Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 12,789 µg veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> , de acordo com a massa molecular em kDa nos	Página 120

tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).

- Quadro 9** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 14,068 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72). Página 121
- Quadro 10** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 15,475 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72). Página 122
- Quadro 11** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 17,795 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48), 72h (T72). Página 123
- Quadro 12** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 18,725 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12), 48h (T48) e 72h (T72). Página 124
- Quadro 13** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 21,533 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 24h (T24). Página 125
- Quadro 14** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 24,762 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de

acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 12h (T12)

- Quadro 15** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 29,995 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 2h (T2) e 24h (T24). Página 127
- Quadro 16** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 47,985 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 24h (T24). Página 128
- Quadro 17** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 76,775 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 24h (T24). Página 129
- Quadro 18** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 105 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 12h (T12) Página 130
- Quadro 19** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 140 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 12h (T12) Página 131
- Quadro 20** Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 210 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12) e 24h (T24) Página 132

- Quadro 21** SDS-PAGE das urinas do animal 16 (350 µg), coletadas em T12, T24. **16/T12:** Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. **16/T24:** Aumento expressivo da concentração de proteinúria de alto e baixo peso molecular entre 245-20 kDa. Com destaque para a faixa entre 60-45 kDa. Página 133
- Quadro 22** Alterações eletrocardiográficas observadas após o envenenamento experimental com peçonha de *L. intermedia* em cobaias, e sua provável origem. Página 137

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Concentrações de veneno de *Loxosceles intermedia* injetadas via intradérmica em cobaias Página 58
- Tabela 2** Concentrações séricas de creatinina, ureia, fósforo e SDMA de cobaias, 24 horas (T24) e 72 horas (T72) após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*. Página 87
- Tabela 3** Intervalo de referência para valores séricos de creatinina, ureia e fósforo em cobaias (*Cavia porcellus*). Página 88
- Tabela 4** Concentrações séricas de CK e sua fração CK-MB de cobaias (*Cavia porcellus*), 24 horas (T24) e 72 horas (T72) após injeção intradérmica do veneno de *Loxosceles intermedia*. Página 92
- Tabela 5** Intervalo de referência para concentração sérica de CK e CK-MB em cobaias (*Cavia porcellus*). Página 93
- Tabela 6** Concentrações séricas de Troponina I de cobaias (*Cavia porcellus*), 24 horas (T24) e 72 horas (T72) após injeção intradérmica do veneno de *Loxosceles intermedia*. Página 95
- Tabela 7** Intervalo de referência para concentração sérica de Troponina I em cobaias (*Cavia porcellus*). Página 96
- Tabela 8** Concentrações séricas de LDH(U/L) de cobaias (*Cavia porcellus*), 24 horas (T24) e 72 horas (T72), após injeção intradérmica do veneno de *Loxosceles intermedia*. Página 97

- Tabela 9** Intervalo de referência para concentração sérica de LDH em cobaias (*Cavia porcellus*). Página 98
- Tabela 10** Concentrações séricas de Proteína Total, Albumina e Globulinas de cobaias (*Cavia porcellus*), 24 horas (T24) e 72 horas (T72), após injeção intradérmica do veneno de *Loxosceles intermedia*. Página 100
- Tabela 11** Intervalo de referência para concentração sérica de proteína em cobaias (*Cavia porcellus*). Página 101

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Microgramas

µL - Microlitros

A:G – Relação Albumina:Globulinas

ALB - Albumina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

CID - Coagulação intravascular disseminada

CK – Creatinaquinase

CK-MB- Fração MB de creatinaquinase

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREAT - Creatinina

DEU – Densidade Específica Urinária

dL - Decilitro

DL50 – Dose Letal mediana

DMN – Dose Mínima Necrosante

ECG - Eletrocardiograma

EDTA- Ácido etilenoaminotetracético

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EV-UFMG- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

FAM – Fosfato-Amoníaco-Magnésiano

GGT – Gama Glutamil Transferase

H - Horas

HE- Hematoxilina-Eosina

HGB - Hemoglobina

HGM- Hemoglobina globular média

ICB-UFMG – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

ID - intradérmica

IRA – Injúria Renal Aguda

IRIS - *International Renal Interest Society*

kDa - Kilodaltons

L - Litros

LABIQM – Laboratório de Imunologia e Bioquímica

LDH- Lactato desidrogenase

mg - miligrama

mL- mililitro

MULTILAB

NT-ProBNP – Peptídeo Natriurético Tipo B

P – Fósforo

PBS- *Phosphate-Buffered Saline*

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

PLQ – Plaquetas

PM – Peso Molecular

PMN - Polimorfonuclear

PSA – Persulfato de Amônio

PT – Proteína Total

RNL – Relação Neutrófilos-Linfócitos

RP/C – Relação Proteína Creatinina Urinária

SDMA - Dimetilarginina Simétrica

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde

T1 – 1 hora após a injeção de veneno

T24 - 24 horas após a injeção de veneno

T48 - 48 horas após a injeção de veneno

T72 - 72 horas após a injeção de veneno

TCTP - Proteínas tumorais controladas de forma translacional

TEMED - Tetrametiletilenodiamina

TGF- Taxa de Filtração Glomerular

TnC – Troponina C

TnI – Troponina I

TnT – Troponina T

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UI – Unidades Internacionais

URE - Ureia

VCM – Volume Corpuscular Médio

VG – Volume Globular

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS	31
LISTA DE TABELAS.....	35
1. Introdução.....	42
2. Objetivos	44
2.1. Geral.....	44
2.2. Específicos.....	44
3. Revisão de Literatura	45
3.1. <i>Loxosceles sp.</i>	45
3.2. Epidemiologia	45
3.3. Caracterização do veneno	47
3.4. Loxoscelismo.....	49
3.4.1. Loxoscelismo cutâneo	49
3.4.2. Loxoscelismo sistêmico	52
3.5. Alterações histopatológicas	54
4. Material e Métodos	56
4.1. Local.....	56
4.2. Animais	56
4.3. Veneno	57
4.4. Protocolo experimental.....	59
4.5. Coleta e processamento inicial das amostras de sangue	59
4.6. Hemograma.....	60
4.7. Perfil bioquímico.....	60
4.8. Urinálise	60
4.9. Eletroforese da urina.....	61
4.10. Eletrocardiograma (ECG).....	63
4.11. Eutanásia	64
4.12. Avaliação Anatomo-histopatológica.....	64
5. Resultados e Discussão.....	66
5.1. Quadro Clínico.....	66
5.2. Hemograma.....	75
5.2.1. Eritrograma	75

5.2.2.	Leucograma	80
5.2.3.	Plaquetograma.....	84
5.3.	Perfil Bioquímico	87
5.3.1.	Biomarcadores renais	87
5.3.2.	Biomarcadores cardiovasculares.....	91
5.3.3.	Proteína total e frações	99
5.4.	Urinálise	104
5.5.	Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) da urina e do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>	113
6.	Eletrocardiograma.....	135
7.	Alterações anatomo-histopatológicas.....	140
8.	Conclusões	169
9.	Referências Bibliográficas	171

1. Introdução

Aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas vulgarmente por “aranhas-marrons” estão amplamente distribuídas em todo o mundo e representam mais de 140 espécies. São consideradas o principal gênero de relevância médica no Brasil, onde, atualmente, 19 diferentes espécies estão descritas em seu território (WORLD SPIDER CATALOG, 2022).

A síndrome clínica observada devido à acidentes de aranhas-marrons é denominada loxoscelismo e se caracteriza pela ocorrência de lesões dermonecroticas com alastramento gravitacional e intensa infiltração leucocitária histológica, por vezes descrita como araneísmo necrótico ou gangrenoso. Em casos mais raros em humanos, pode haver manifestações sistêmicas que versam com insuficiência renal e distúrbios hematológicos, tais como hemólise intravascular e anemia hemolítica (FUTTREL, 1992; MALAQUE *et al.*, 2011; VETTER E SWANSON, 2022).

Estes sinais clínicos causados pelo veneno loxoscélico se dão por processos multifatoriais complexos, que incluem toxicidade direta sob as membranas celulares, danos sobre a matriz extracelular, ativação plaquetária e a liberação de mediadores lipídicos, citocinas e quimiocinas (REES *et al.*, 1984; GOMEZ *et al.*, 1999; VEIGA *et al.*, 2000; PALUDO *et al.*, 2006; BARBARO *et al.*, 2010; NOWATZKI *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2011). Apesar de possuírem composição molecular complexa, contendo diversas proteínas de características bioquímicas distintas, existe uma família de toxinas conhecidas por fosfolipases-D, que desencadeia os principais sinais clínicos do loxoscelismo (GREMSKI *et al.*, 2020).

O primeiro estudo experimental do loxoscelismo documentado na literatura foi realizado por Macchiavello em 1947. Nesta pesquisa, o autor descreveu os estágios de dermonecrose em cobaias após picada espontânea por *Loxosceles laeta*. Desde então, para melhor investigação desta síndrome, diversos modelos de animais têm sido utilizados *in vivo* ou *in vitro*.

Apesar de amplamente utilizados em diversos estudos experimentais, pouco se sabe sobre os efeitos sistêmicos causados pelo veneno de *Loxosceles* em cobaias (*Cavia porcellus*), sendo mais comum a utilização de ratos, camundongos e principalmente coelhos nos estudos mais recentes. Desta forma, o seguinte estudo

visa avaliar os efeitos do veneno de *L. intermedia* em diferentes dosagens aplicadas via intradérmica em cobaias, com ênfase nas lesões renais e cardíacas.

1. Objetivos

1.1. Geral

Avaliar as alterações sistêmicas e locais causadas após inoculação intradérmica de diferentes concentrações de veneno de *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) em cobaias.

1.2. Específicos

Descrever a ocorrência de sinais clínicos sistêmicos e lesões locais em cobaias causados pelo veneno de *L. intermedia*, e caracterizá-las quanto à gravidade.

Estudar o perfil sanguíneo de cobaias inoculadas com veneno de *L. intermedia*.

Avaliar as alterações no perfil urinário de cobaias inoculadas com veneno de *L. intermedia*, por meio da urinálise, análise eletroforética da urina e painel bioquímico sérico renal.

Relatar as alterações cardíacas de cobaias inoculadas com veneno de *L. intermedia*, por meio de eletrocardiograma e painel bioquímico sérico/plasmático cardíaco.

Realizar análise anátomo-histológica de lesões dermonecroticas, renais e cardíacas causadas pelo veneno de *L. intermedia*.

2. Revisão de Literatura

2.1. *Loxosceles sp.*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família *Sicariidae*, subordem *Labidognatha*, ordem *Araneida*, classe *Arachnida* e filo *Arthropoda* (APPEL *et al.*, 2005). São conhecidas popularmente por aranha-marrom, aranha-reclusa castanha ou aranha-violinista, esta última devido ao formato similar ao de um violino observado em seu cefalotórax (LOPES *et al.*, 2020). São aracnídeos de pequeno porte, com tamanho variável entre 1 a 5 cm de comprimento, incluindo suas pernas. A disposição dos olhos é descrita como a principal forma de identificação das aranhas-marrom: possuem seis pares de olhos dispostos em pares, um par frontal e dois laterais. Apresentam dimorfismo sexual, os machos possuem corpo menor e patas mais longas que as fêmeas, que por isso conseguem injetar mais veneno (DA SILVA *et al.*; 2004; GREMSKI *et al.*, 2014).

São capazes de sobreviver por meses sem acesso à alimentação e suportam temperaturas que podem variar entre 8 a 43°C. São animais de hábitos noturnos e sedentários, que vivem em áreas escuras e constroem teias com tramas similares à fios de algodão. No ambiente domiciliar, geralmente se encontram entre armários, gavetas e sapatos. O comportamento das aranhas do gênero *Loxosceles* não é agressivo. Os acidentes geralmente ocorrem quando são pressionadas contra o corpo da vítima (GREMSKI *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2020). O veneno das aranhas-marrom é produzido em duas glândulas localizadas na região do cefalotórax e é utilizado para paralisar suas presas (insetos, outros artrópodes e pequenos vertebrados), e também como mecanismo de defesa (DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2005; GREMSKI *et al.*, 2021).

2.2. Epidemiologia

No Brasil, existem três gêneros de aranha de importância médica: *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Latrodectus* que são responsáveis por acidentes causados por aracnídeos (CRISTIANO *et al.*, 2009). Desses, os acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* representam a maioria dos casos notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Atualmente, estão descritas 140 espécies de aranhas deste gênero, distribuídas em todos os continentes, 19 delas encontradas no Brasil. Dentre essas, cinco (*Loxosceles similis*, *Loxosceles rufescens*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaúcho* e *Loxosceles reclusa*) são responsáveis pela maior parte dos casos de envenenamento, principalmente nas regiões sudeste e sul do país (SILVEIRA *et al.*, 2000; GREMSKI *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2020).

O número de casos de acidentes envolvendo aranhas-marrom no Brasil, tem crescido exponencialmente desde a primeira vez que foram descritos por Rosenfeld *et al.* (1957), sendo considerado um problema de saúde pública. Nos últimos anos, foi possível observar um grande aumento do número de acidentes envolvendo humanos (Quadro 1). Este fato pode ser resultado do desequilíbrio ecológico causado pelo desmatamento e extinção de predadores naturais, mudanças climáticas e práticas de manejo de pragas, como uso indiscriminado de pesticidas, o que implicou na adaptação de aranhas ao ambiente urbano e consequente coabitação do gênero com humanos e animais domésticos (GREMSKI *et al.*, 2014).

Quadro 1: Notificação de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (1975-2022) no Brasil

Ano	Número de notificações
2007	9356
2008	8088
2009	8533
2010	7971
2011	8121
2012	7542
2013	7870
2014	7263
2015	7885
2016	7474
2017	8111
2018	8658
2019	8900
2020	7200
2021	6512

2022	6390
Total	125.969

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

No Brasil, na medicina humana, os acidentes causados por aranhas-marrom devem obrigatoriamente reportados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação obrigatória do Ministério da Saúde (SINAN). Em contrapartida, em medicina veterinária há uma carência de dados em relação aos casos de loxoscelismo, porém, estima-se que o aumento de casos acompanha o aumento observado em humanos, especialmente em cães e gatos, o que pode ser explicado pelo estreitamento da relação intradomiciliar dos animais domésticos (COLLACICO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2009).

2.3. Caracterização do veneno

O veneno, líquido, de aparência cristalina e incolor, é produzido por glândulas apócrinas localizadas no cefalotórax das aranhas-marrom, que se comunicam com o exterior através de dois ductos que se conectam ao aparelho inoculador, que é formado por um par de quelíceras. Possui uma composição molecular complexa, capaz de provocar efeitos nocivos em mamíferos, contendo diversas toxinas de natureza essencialmente proteica, com predominância de massa molecular variando entre 3-40 kDa (MARTINEZ-VARGAS, 1987; FUTRELL, 1992; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DE CASTRO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; MOURA, 2005).

O volume de veneno produzido é pequeno, podendo ser extraídos cerca de 2 µL, que contêm aproximadamente entre 20-200 µg de proteínas totais (BINFORD e WELLS, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; MOURA, 2005; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Em sua composição, foram descritas moléculas altamente expressas, como fosfolipases-D, astacina-metaloproteases e peptídeos de função inseticida de baixa massa molecular (caracterizados como peptídeos ICK). Esses elementos formam a maioria das toxinas presentes na glândula de veneno de *L. intermedia* (aproximadamente 95%) (DA SILVA *et al.*, 2004; DE CASTRO *et al.*, 2004; DA SILVEIRA *et al.*, 2007a; GREMSKI *et al.*, 2010; MATSUBARA *et al.*, 2013). Outras toxinas de menor nível de expressão, como hialuronidase, serina proteases, inibidores

de serina proteases, alérgenos de veneno e proteínas tumorais controladas de forma translacional (TCTP), foram identificados no veneno (DE CASTRO *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2010; SADE *et al.*, 2012; FERRER *et al.*, 2013).

O maior componente tóxico do veneno loxoscélico (30-35 kDa) é conhecido como fosfolipase-D, mas também referido como proteínas Loxtox, toxina dermonecrótica ou esfingomielinase D. Essa enzima, através do sinergismo entre suas isoformas, é a principal responsável pelos efeitos locais e sistêmicos do loxoscelismo, sendo a toxina loxoscélica mais estudada e bem caracterizada (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; CHAIM *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2010; GREMSKI *et al.*, 2016).

A fosfolipase-D é capaz de catalisar e hidrolisar a esfingomielina formando ceramida-fosfato e colina, provocando a indução de resposta inflamatória, aumento de permeabilidade vascular, dermonecrose, agregação plaquetária, trombocitopenia, hemólise e injúria renal aguda (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; PEDROSA *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2005; FERRARA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017). Além disso, também possui atividade inseticida, através de efeitos neurotóxicos e citotóxicos em insetos (ZOBEL-THROPP *et al.*, 2012).

As metaloproteases Loxolisina A (20-28 kDa) e Loxolisina B (32-35 kDa) possuem ação gelatinolítica, e atividades fibrinolíticas e fibrinogenolíticas, causando distúrbios hemostáticos que ocorrem após envenenamento como lesão de vasos sanguíneos, hemorragia dérmica, adesão plaquetária e déficits de cicatrização, atuando como um fator de disseminação sistêmica do veneno (FEITOSA *et al.*, 1998; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; ZANETTI *et al.*, 2002). Já os peptídeos ICK (5,6 – 7.9 kDa) apresentam atividade inseticida e foram nomeados LiTx1, LiTx2 e LiTx3 (GREMSKI *et al.*, 2020).

Dentre as proteínas de baixo nível de expressão, podemos destacar a hialuronidase (44kDa). Esta enzima é apontada como um facilitador de difusão do veneno, devido à sua capacidade de hidrolisar o tecido conjuntivo e degradar o ácido hialurônico, que, juntamente à ação das gelatinases, contribuem para a formação do alastramento gravitacional característico do loxoscelismo. Além disto, a hialuronidase pode causar distúrbios na matriz extracelular, gerando edema, eritema e necrose no local da picada (BARBARO *et al.*, 1992; TAN AND PONNUNDURAI, 1992;

BIRKEDAL-HANSEN *et al.*, 1993; GOMEZ *et al.*, 2001a; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2017). As TCTP, também nessa faixa (46 kDa) são proteínas indutoras da liberação de histaminas (MCDONALD *et al.*, 1995) e fortalina (LI *et al.*, 2001), e provocam a ocorrência de edema e aumentam a permeabilidade vascular (SADE *et al.*, 2012).

2.4. Loxoscelismo

O envenenamento, usualmente, causa uma lesão necrosante no local da picada com alastramento gravitacional e, eventualmente, induz efeitos sistêmicos, que podem envolver hemólise intravascular, trombocitopenia e injúria renal aguda, englobados na entidade nosológica denominada loxoscelismo. Desta forma, a classificação do loxoscelismo é definida em duas variantes clínicas: cutâneo e sistêmico/viscerocutâneo (MALAQUE *et al.*, 2002; GREMSKI *et al.*, 2014; DE MIRANDA *et al.*, 2021).

A severidade das manifestações clínicas é variável devido a uma série de fatores, dentre eles, a quantidade de veneno injetado, a localização da picada e susceptibilidade individual da vítima. Também variam de acordo com a espécie, sexo e idade da aranha envolvida (BERNSTEIN E EHRLICH, 1986; FUTRELL, 1992; SEZERINO *et al.*, 1998; BARBARO e CARDOSO, 2003).

Em humanos, casos sistêmicos ocorrem com menor frequência em relação aos casos cutâneos. Cerca de 16% dos casos adquirem características viscerocutâneas, e 83% assumem formas dermonecroticas. Apesar de menos comum, o loxoscelismo sistêmico pode gerar complicações clínicas que podem ser fatais, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 0,2% (RIBEIRO *et al.*, 1993; SCHENONE *et al.*, 1989). Todavia, na veterinária, os relatos de casos sistêmicos em cães, têm aumentado de forma considerável nas clínicas e hospitais veterinários (RODRIGUES, 2021).

2.4.1. Loxoscelismo cutâneo

A reação local referente à picada de *Loxosceles* sp. pode variar consideravelmente, a depender da influência do estado de saúde da vítima, grau de obesidade, local da picada, entre outros fatores (DA SILVA *et al.*, 2004; GREMSKI *et al.*, 2021). Apesar de os relatos médicos de loxoscelismo geralmente apresentarem

quadros de severo dano dermonecrótico, em grande parte dos casos as lesões são irrelevantes ou mínimas e sequer necessitam de atenção clínica (LOPES *et al.*, 2020).

Geralmente, as vítimas manifestam lesões cutâneas que progridem lentamente e quadros mais graves de loxoscelismo cutâneo podem culminar em dermonecrose com alastramento gravitacional associada à intensa resposta inflamatória, que é a principal característica deste envenenamento (MALAQUE *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; MALAQUE *et al.*, 2011; GREMSKI *et al.*, 2021).

Clinicamente, a evolução de lesões cutâneas causadas pela picada de uma aranha do gênero *Loxosceles*, pode ser descrita. Inicialmente, a picada é indolor e, por isso, normalmente, as vítimas humanas somente notam o ocorrido entre 2 a 8 horas após, quando apresentam algia da região afetada, que pode variar entre leve incômodo à dor intensa. Juntamente, pode-se observar a ocorrência de máculas e eritema transitório com prurido, inchaço e sensibilidade local. Após 12 a 24 horas após o acidente, em casos brandos, a região da picada apresenta somente eritema, contudo, em casos mais graves, a base capilar é destruída e as lesões adquirem coloração azulada-arroxeadada ou esbranquiçada com desenvolvimento de equimose e anel isquêmico. Na literatura humana é descrita como uma lesão em “placa marmórea” (FUTRELL, 1992; MARTINS *et al.*, 2014; VETTER, 2018).

Devido à esta apresentação tardia do quadro clínico, o diagnóstico na maioria das vezes é presuntivo, e os sinais clínicos podem ser confundidos com infecções virais ou bacterianas, acidentes provocados por serpentes, úlceras provocadas por diabetes, dermatites ou vasculites (VETTER e ISBISTER, 2008).

Nos dias que se sucedem, as lesões necróticas adquirem coloração azulada arroxeadada opaca, com disseminação gravitacional. Em pacientes obesos, a dermonecrose é mais extensa, devido à insuficiência vascular. Três a sete dias após a exposição ao veneno, a lesão atinge sua máxima dimensão, e pode haver a formação de escara seca, plana ou ligeiramente afundada. Na semana seguinte, a lesão endurece, principalmente sua área central, e essa escara se desfaz, deixando uma úlcera de difícil cicatrização, mas que pode ser autolimitante, havendo melhora em seis a oito semanas, ou, em alguns casos, requer tratamento médico avançado, como procedimentos cirúrgicos, entre outros (FUTRELL, 1992; VETTER, 2018).

Casos de loxoscelismo cutâneo também podem apresentar prurido, erupções cutâneas e edema. Também podem estar associados com a presença de sinais sistêmicos não específicos, como dores de cabeça, vômito, náusea, febre e mal-estar (LOPES *et al.*, 2020; GREMSKI *et al.*, 2021).

Na Medicina Veterinária, principalmente em cães, o loxoscelismo é o acidente mais comum, e sua frequência pode ser ainda maior do que a descrita na rotina clínica. Isso se deve principalmente à ausência de um teste diagnóstico comercial específico, aliado ao fato de as aranhas não serem capturadas e identificadas, e, principalmente, pela pouca familiaridade da maioria dos médicos veterinários com acidentes por araneídeos (Figura 1).



Figura 1: Cão da raça Pastor Mallinois, macho, após acidente com aranha-marrom. São observadas lesões dermonecroticas, com eritema e escaras. Fonte: Arquivo Pessoal.

Alguns animais evoluem com grandes áreas de necrose sendo necessário o desbridamento cirúrgico (Figura 2).



Figura 2. Cão adulto, macho, da raça Pastor Mallinois, após acidente com aranha-marrom e desbridamento cirúrgico. Fonte: Arquivo Pessoal

2.4.2. Loxoscelismo sistêmico

Menos comum que sua forma cutânea, o loxoscelismo sistêmico é caracterizado pela ocorrência de injúria renal aguda (IRA), trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada (CID) e, principalmente, hemólise intravascular. Os sinais clínicos comuns são hematúria e hemoglobinúria, icterícia, febre e náusea. Geralmente, os sinais e sintomas sistêmicos ocorrem anteriormente à ocorrência de dermonecrose, entre 24 a 48 horas após a picada, o que dificulta o diagnóstico e, conseqüentemente, o tratamento (FUTRELL, 1992; MALAQUE *et al.*, 2011; GREMSKI *et al.*, 2014; VETTER, 2018; LOPES *et al.*, 2020).

Acredita-se que uma série de mecanismos moleculares/celulares e vias patogênicas estão envolvidas no desenvolvimento das alterações sistêmicas do loxoscelismo, sendo a toxina dermonecrótica sua principal causadora (BARBARO e CARDOSO, 2003). Essa é capaz de gerar uma grave resposta inflamatória, caracterizada pela produção de citocinas e quimiocinas, bem como ativação do sistema-complemento e óxido nítrico, que culminam em migração leucocitária e agregação plaquetária (MALAQUE *et al.*, 1999; ZANETTI *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2007). Em coelhos, a primeira

resposta sistêmica observada ao veneno de *L. intermedia* é uma queda abrupta na contagem plaquetária e na dosagem de fibrinogênio. Estes sinais ocorrem nas primeiras 12 horas após o envenenamento e leucopenia nas primeiras 24 horas (PAULI *et al.*, 2009).

Diversos efeitos citotóxicos estão associados à ação da esfingomielinase-D. Esta toxina é transportada entre os eritrócitos, e possui efeito direto sobre eles, causando hemólise intravascular (responsável pela ocorrência de anemia hemolítica, icterícia e hemoglobinúria) (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; TAMBOURGI *et al.*, 2000, 2007). Segundo estudo feito em coelhos por PAULI *et al.*, (2009), é possível observar uma queda na contagem eritrocitária nas primeiras 48 horas após o envenenamento. Martins *et al.* (2022) também relataram discreto decréscimo na contagem eritrocitária total, no hematócrito (VG) e contagem de hemoglobina, 72 horas após o envenenamento loxoscélico experimental (*Loxosceles laeta*) em todos os coelhos que receberam veneno, independentemente do tratamento instituído, com retorno à normalidade seis dias após a inoculação do veneno

O veneno também causa danos diretos à membrana endotelial vascular (ZANETTI *et al.*, 2002). Segundo Nowatzki *et al.*, (2012), o veneno induz alterações na adesão celular e retração celular, seguido por descolamento e, por fim, aciona um mecanismo apoptótico conhecido como “anoikis”. Esses efeitos fragilizam os vasos capilares e causam hemorragias. Além disto, esta ação gera uma cascata de eventos bioquímicos que culmina em uma ativação exacerbada de leucócitos e plaquetas (PATEL *et al.*, 1994; PALUDO *et al.*, 2006). Todos esses fatores, acrescidos à agregação plaquetária e à deposição de fibrina, criam um ambiente favorável à deposição de trombos intravasculares, aumento de permeabilidade vascular e, conseqüentemente, ao quadro de coagulação intravascular disseminada (CID) (ZANETTI *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004, PALUDO *et al.*, 2006; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

A IRA é a principal causa de óbito em casos de loxoscelismo. Os rins são órgãos altamente vascularizados e, por isso, estão vulneráveis a lesões causadas por elementos tóxicos, através de alterações hemodinâmicas que podem causar isquemia renal, processos inflamatórios ou por nefrotoxicidade direta (SITPRIJA, 2012). É observada em pacientes que apresentam extensa hemólise intravascular e rabdomiólise (causada pela intensa destruição tecidual), devido à deposição de

hemoglobina nos túbulos renais. Porém, Luciano *et al.*, (2004), demonstraram que também há ação direta do veneno de *Loxosceles* nos rins, sendo esse, capaz de causar edema glomerular e nefrose tubular (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2006, 2007a).

O efeito nefrotóxico do veneno loxoscélico pode ser demonstrado por meio das características clínicas, laboratoriais e histopatológicas, o que pode incluir o aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina, hematúria, hemoglobinúria, bilirrubinúria, mioglobínúria, proteinúria e choque (BEY *et al.*, 1997; FRANÇA *et al.*, 2002; LUNG AND MALLORY, 2000; WILLIAMS *et al.*, 1995).

Além disso, por meio de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), foi atestada a presença de altas concentrações de veneno nos rins, coração, pulmões e fígado de ratos envenenados experimentalmente (CHÁVEZ-OLÓRTEGUI *et al.*, 1998). Outros estudos também reportaram ação cardiotoxica e hepatotóxica em camundongos inoculados com veneno de *L. intermedia* (LOPES *et al.*, 2020). Segundo Dias-Lopes *et al.* (2010), os efeitos cardiotoxicos podem desempenhar um papel no quadro clínico do loxoscelismo sistêmico, uma vez que as toxinas podem desenvolver uma disfunção cardíaca em ratos envenenados.

A gravidade do quadro pode ser estimada pelas características clínicas e exames laboratoriais, como a ocorrência de hemólise e a presença de níveis alterados da atividade enzimática de creatina quinase, que indicam rbdomiólise e determinam a apresentação de loxoscelismo víscero-cutâneo e, necessidade de intervenção para tratamento suporte (GREMSKI *et al.*, 2014).

É importante salientar que a esfingomielinase D possui habilidade de se vincular em células de diversas espécies, como humanos, ovelhas, ratos, camundongos, coelhos e cobaias (REES *et al.*, 1984; TAMBOURGI *et al.*, 1995, 2000; VAN DEN BERG *et al.*, 2002). E, através de estudos em modelos murinos realizados por Tambourgi *et al.* (1998), foi possível demonstrar que a susceptibilidade aos efeitos sistêmicos ao veneno de *L. intermedia* varia entre diferentes animais.

2.5. Alterações histopatológicas

Os achados histopatológicos estão na dependência do tempo de coleta do material após inoculação do veneno (MELO *et al.*, 2004). As alterações dermato-

histopatológicas incluem edema, espessamento endotelial dos vasos sanguíneos, infiltração leucocitária, vasodilatação, destruição das paredes dos vasos sanguíneos e hemorragia. Além disto, um dos principais efeitos do envenenamento é a ocorrência de coágulos intravasculares (FUTRELL, 1992; OSPEDAL *et al.*, 2002). Elston *et al.* (2000) sugeriram que a trombose capilar é um evento precoce, e antecede o influxo de leucócitos.

Em estudos realizados por Veiga *et al.* (2001a), após aplicação intradérmica de veneno loxoscélico em coelhos, foram demonstradas instabilidade dos vasos, vacuolização das células endoteliais citoplasmáticas, perda de adesão endotelial e formação de bolhas. Após 4 horas observou-se o aparecimento de edema subcutâneo e muscular, hemorragia, degeneração vascular, exsudação de conteúdo plasmático, trombose, acúmulo de neutrófilos intra e extravascular com intensa diapedese, coleção dérmica de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Este último, sendo considerado uma das alterações típicas do loxoscelismo cutâneo, é recrutado por ativação indireta do sistema complemento e é apontado como o maior causador de lesão cutânea (WARD e COCHRANE, 1965; SMITH e MICKS, 1970; SUNDERKOTTER *et al.*, 2001; TAMBOURGI *et al.*, 2005). Cerca de cinco dias após a injeção, observa-se uma intensa infiltração neutrofílica dérmica e subcutânea, com destruição de vasos sanguíneos, trombose, hemorragia, mionecrose e necrose coagulativa (OSPEDAL *et al.*, 2002).

Análises histopatológicas nos rins de ratos após envenenamento experimental demonstraram hialinização e presença de eritrócitos na cápsula de Bowman, colapso glomerular, citotoxicidade sob endotélio tubular e deposição de material proteico no lúmen tubular. Ensaios de imunofluorescência apontaram deposição e ligação de toxinas nas estruturas tubulares e glomerulares, que juntamente à ausência de hemoglobina, corroboraram com a hipótese de dano direto causado pelo veneno loxoscélico (LUCIANO *et al.*, 2004).

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome associada a diversos fatores etiológicos e com variadas manifestações clínicas. O termo abrange alterações renais que incluem desde elevação mínima na creatinina sérica até falência renal e anúria. Apesar de a literatura abordar a IRA no loxoscelismo, nenhum trabalho aborda a urinálise, exame essencial para avaliação dessa condição e imperativo no loxoscelismo.

3. Material e Métodos

Este projeto, bem como todos os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Protocolo nº 131/2020 UFMG. O presente projeto também foi submetido e aprovado pela Câmara Departamental do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias e pelo Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal.

3.1. Local

O experimento foi realizado na Escola de Veterinária (EV-UFMG) e no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Foram utilizados o Laboratório de Toxicologia Veterinária (EV-UFMG), o Laboratório de Bioquímica e Imunologia (ICB-UFMG) e a Unidade Multidisciplinar de Pesquisa Animal (MULTILAB). Parte do projeto também foi realizado no Hospital Veterinário Santo Agostinho, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.2. Animais

Foram utilizados 18 animais machos, cobaias (*Cavia porcellus*) da linhagem *English Short Ear*, com peso médio de 600 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do MULTILAB e acomodados em gaiolas metálicas individuais de 42 cm de largura, 38 cm de largura e 55 cm de comprimento. Abaixo da gaiola, foram colocadas prateleiras metálicas contendo maravalha (Figura 3).

Os animais ficavam em temperatura controlada por ar condicionado (25°C), com aporte de luz natural. Eram fornecidos água fresca, ração comercial (Mix Roedor - Porquinho-da-índia e Mini Coelho Reino das Aves®) e feno desidratado *ad libitum*.



Figura 3. Cobaias nas gaiolas de experimentação no biotério do Laboratório Multiusuário da Escola de Veterinária da UFMG. Fonte: Arquivo Pessoal

Para o experimento, foi realizada a tricotomia dos animais em quatro regiões: região interescapular, região lateral torácica, região do pescoço e região abdominal.

A escolha do modelo experimental (*Cavia porcellus*) está relacionada ao estudo sistêmico do loxoscelismo, além de ser uma espécie de fácil manuseio, com porte adequado para realização dos protocolos experimentais.

3.3. Veneno

Um *pool* de veneno de *Loxosceles intermedia* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtégui, do Banco de Venenos do Laboratório de Imunologia e Bioquímica (LABIQM).

Foi realizada a concentração total de proteína da amostra de veneno pelo método de Lowry. Para tal, elaborou-se uma curva padrão, onde obteve-se um fator de calibração médio para calcular a concentração de proteínas do veneno, que revelou uma concentração proteica de 3,5 µg/µL (Figura 4).

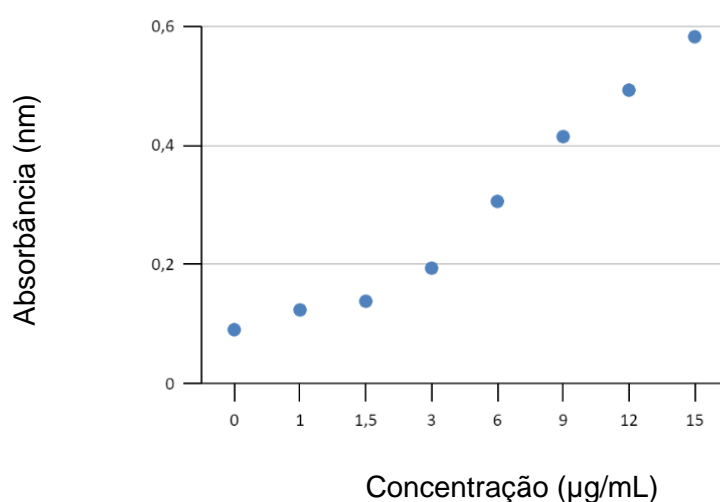


Figura 4. Concentração total de proteína da amostra de veneno de *Loxosceles intermedia* realizada pelo método de Lowry.

Foram aplicadas várias doses de veneno de *Loxosceles intermedia* (Tabela 1) em cobaias para se avaliar o efeito sistêmico do mesmo. Essas foram baseadas na DL₅₀ de camundongo e na concentração proteica que poderia ser injetada por um espécime adulto da aranha *L. intermedia*.

Tabela 1: Concentrações de veneno de *Loxosceles intermedia* injetadas via intradérmica em cobaias

Animal (n=18)	Concentração de veneno (µg)
Cobaia controle 1	0 µg
Cobaia controle 2	0 µg
Cobaia 1	11,627 µg
Cobaia 2	12,789 µg
Cobaia 3	14,068 µg
Cobaia 4	15,475 µg
Cobaia 5	17,795 µg
Cobaia 6	18,725 µg
Cobaia 7	21,533 µg
Cobaia 8	24,762 µg
Cobaia 9	28,477 µg

Cobaia 10	29,995 µg
Cobaia 11	47,985 µg
Cobaia 12	76,775 µg
Cobaia 13	105 µg
Cobaia 14	140 µg
Cobaia 15	210 µg
Cobaia 16	350 µg

3.4. Protocolo experimental

O veneno foi aplicado via intradérmica (ID) na região interescapular, utilizando seringa de insulina descartável de 0,5 mL. Para padronização do volume aplicado, foi acrescentada solução salina 0,9% para completar o volume de 0,25 µL em todas as aplicações. Os animais-controle receberam injeção ID de 0,25 µL de solução salina 0,9%, também na região interescapular. Todas as cobaias foram tricotomizadas na região interescapular para avaliação de alterações locais após a injeção do veneno/solução salina 0,9%.

3.5. Coleta e processamento inicial das amostras de sangue

Foram coletadas amostras de sangue dos animais em tempos previamente determinados, nos momentos 0 (antes da injeção do veneno), e após, 1, 24 e 72 horas.

As amostras foram coletadas através de punção da veia jugular, utilizando seringas de 1,0 mL. O sangue coletado era acondicionado em microtubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%, para realização de hemograma, tubo contendo gel ativador de coágulo, e tubo contendo anticoagulante citrato de sódio 3,2%, para obtenção de soro e plasma citratado, para realização de exames bioquímicos. O soro e o plasma foram obtidos através de centrifugação da amostra na velocidade de 3500 rpm durante 10 minutos, e 3000 rpm durante 15 minutos, respectivamente. Em seguida, as amostras foram alíquotadas e armazenadas em microtubos devidamente identificados e congelados a -20°C até o momento de processamento, quando foram descongeladas.

3.6. Hemograma

O hemograma foi processado em analisador hematológico automatizado (PocH-100iV Diff, Sysmex Corporation), para determinação dos valores referentes ao número de leucócitos totais, eritrócitos, volume globular (VG), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e plaquetas (PLQ). Para contagem diferencial de leucócitos (valores relativos) e análise morfológica celular, foram confeccionados esfregaços sanguíneos utilizando lâminas de vidro para microscopia, fixados com metanol e corados com panótico.

3.7. Perfil bioquímico

Para as análises bioquímicas, foram utilizados kits comerciais (Biotécnica e Bioclin) para dosagem de creatinina (CREAT), ureia (URE), creatinofosfoquinase (CK), creatinofosfoquinase MB (CK-MB), proteína total (PT), albumina (ALB), lactato desidrogenase (LDH) e fósforo (P), por espectrofotometria, utilizando analisadores bioquímicos automáticos (COBAS MIRA PLUS e SMART VET).

Já para dosagem de troponina I, do fragmento N-terminal do peptídeo natriurético tipo B (NT-ProBNP) e D-dímero foram utilizados kits Eco Diagnóstica para análise pela técnica de Imunoensaio de fluorescência com marcador európio, em equipamento ECO Reader F200.

Dimetilarginina simétrica (SDMA) foi dosada utilizando Teste Catalyst SDMA IDEXX do analisador bioquímico Catalyst One IDEXX.

3.8. Urinálise

A urina das cobaias foi coletada através de micção espontânea. No momento do experimento, era retirada a maravalha da bandeja plástica posicionada abaixo da gaiola metálica, que era higienizada e desinfetada. Quando os animais urinavam, as amostras de urina eram então coletadas. Foram coletadas amostras de urina nas primeiras 12 horas após a inoculação do veneno, em seguida, após 24 horas, 48 horas e 72 horas. Foram realizados exames físico, químico, bioquímico e sedimentoscopia das amostras de urina coletadas.

No exame físico, foram avaliados cor, turbidez, odor, densidade específica urinária e volume. Para determinação da Densidade Específica Urinária, foi utilizado refratômetro após a centrifugação da amostra.

No exame químico, foram utilizadas tiras reagentes semiquantitativas para análise semiquantitativa de substâncias de interesse, como presença de proteínas, glicose, corpos cetônicos, sangue oculto e bilirrubina, além de determinação do pH da urina. Devido ao pequeno volume de amostras de urina coletadas, a urina era pipetada e colocada sobre as plataformas-teste, em seguida lateralizadas para retirada do excesso de amostra e análise dos resultados. Os resultados são graduados de acordo com a concentração da substância de interesse na amostra.

Para os exames bioquímico e sedimentoscopia, as amostras foram centrifugadas em 1500 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante era aspirado, reservado e congelado a -20°C para a realização dos exames bioquímicos. As amostras foram descongeladas no momento do processamento. O sedimento restante era novamente suspenso e homogeneizado, sendo uma gota dessa solução colocada em lâmina e recoberta com lamínula e analisada por microscopia óptica.

Nos exames bioquímicos, foram utilizados kits comerciais (Biotécnica) para dosagem de gama glutamiltransferase (GGT), proteína total urinária, creatinina urinária e a relação proteína/creatinina urinária (RP/C), pelo método de colorimetria e turbidimetria em analisador automático de bioquímica e turbidimetria Smart 200+®.

No exame do sedimento, foram observadas e analisadas a presença de hemácias, bactérias, células epiteliais, cilindros, cristais e muco nas amostras de urina coletadas.

3.9. Eletroforese da urina

As amostras de urina coletadas das cobaias foram aliquotadas no momento da coleta. Cerca de 100 μL foram reservados e congelados a -20°C para a realização de eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page).

Anteriormente à execução dos géis de separação e empilhamento, que formam o suporte, as placas de vidro foram higienizadas com etanol 70% e após secagem

eram instaladas no aparato de eletroforese, que permite que o suporte seja montado verticalmente. Em seguida era feita uma verificação de montagem para averiguar a ausência de vazamentos.

Para cada gel de separação, foi utilizada uma concentração de 12% de Acrilamida. Na execução, foram utilizados:

1. 2,0 mL de Acrilamida/Bis-Acrilamida 30%;
2. 1,3 mL de Tampão Tris 1,5 M pH 8,8;
3. 50 μ L de SDS 10%;
4. 1,6 mL de Água Destilada;
5. 50 μ L de Persulfato de Amônio (PSA) 10%;
6. 0,002 mL de tetrametiletilenodiamina (TEMED).

Esta solução era alojada entre as placas e adicionado 300 μ L de Butanol em seguida. Este solvente imiscível tem a função de auxiliar na verificação da polimerização do gel nas placas. Após a formação do gel, o solvente era descartado.

Para o gel de concentração, foi utilizada uma concentração de 5% de Acrilamida. Para a execução deste, foi utilizado:

1. 0,33 μ L de Acrilamida/Bis-Acrilamida 30%;
2. 0,25 mL Tampão Tris 0,5 M pH 6,8;
3. 20 μ L de SDS 10%;
4. 1,4 mL de Água Destilada;
5. 20 μ L de PSA 10%;
6. 2 μ L de TEMED.

Esta solução de empilhamento era adicionada sobre o gel de separação até o limite superior das placas. Em seguida, era colocado o pente para cubas. Após a formação do gel, o pente era retirado e as amostras de urina eram preparadas para a aplicação.

As amostras de urina foram descongeladas, centrifugadas em 1500 rpm, durante 5 minutos e 1 μ L do sobrenadante era coletado e adicionado em microtubo contendo 25 μ L de solução tampão de amostra do tipo Laemmli SDS Buffer. Na

sequência, a solução era homogeneizada, colocada a 100°C em banho maria por 5 minutos e aplicada com auxílio de pipeta nos poços marcados no suporte. Em todos os testes, no primeiro poço foi inserido o padrão de peso molecular.

Em seguida, era feita a montagem do sistema de corrida, onde os aparatos do suporte eram colocados nas cubas eletrolíticas, com adição do tampão de corrida, e conectados à fonte de energia, com voltagem de 100 V, para um gel, ou 150 V, para dois géis.

Quando a migração das proteínas se findava, os suportes eram retirados dos aparatos, imersos em corante azul de Coomassie e mantidos em homogeneizador por aproximadamente 48 horas. Posteriormente, os géis eram colocados em solução descolorante para remover o corante não ligado, facilitando a exposição dos resultados.

3.10. Eletrocardiograma (ECG)

Os animais foram submetidos à avaliação cardíaca através da realização de eletrocardiograma computadorizado, utilizando aparelho INCardio Agile®. Os exames foram feitos nas derivações pré-cordiais (I, II, III, avL, avF, avR) e analisadas na derivação II (DII), na velocidade de 50 mm/s, com amplitude de 2N. Os animais eram mantidos em estação e os eletrodos foram posicionados conforme a imagem (Fig. 5). Foram gravados os traçados durante 5 minutos corridos.

Os eletrocardiogramas foram realizados no tempo zero, anteriormente à aplicação do veneno/solução fisiológica 0,9%, imediatamente após a aplicação, e após 12, 24, 48 e 72 horas do desafio.



Figura 5. Posicionamento dos eletrodos do eletrocardiograma em cobaia. Fonte: Arquivo Pessoal.

3.11. Eutanásia

As cobaias que não vieram à óbito em até 72 horas após a aplicação do veneno foram submetidos à eutanásia, após realização das coletas de sangue e urina. O procedimento foi realizado de acordo às normativas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e segundo recomendações do CEUA/UFMG. Para a eutanásia, foi empregado o uso do anestésico inalatório isoflurano.

3.12. Avaliação anátomo-histopatológica

A necropsia dos animais foi realizada após o óbito ou eutanásia, quando foram coletadas amostras para o exame histopatológico. Foram obtidos fragmentos de coração, rins, pele, fígado, cérebro, pulmões, estômago, intestinos e baço, que foram fixados em formalina 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Em seguida, foram feitas secções histológicas de 4 μ m e coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas obtidas foram avaliadas em

microscópio óptico sem o conhecimento prévio das doses de veneno aplicadas em cada um dos animais.

4. Resultados e Discussão

4.1. Quadro Clínico

As alterações clínicas, locais e sistêmicas apresentados pelos animais estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2: Alterações clínicas (locais e sistêmicas) após injeção intradérmica de diferentes doses de veneno de *Loxosceles intermedia* em cobaias.

Animal/ dose aplicada de <i>L. intermedia</i> (μg)	Quadro clínico após inoculação intradérmica de veneno de <i>L. intermedia</i>
Controle A/ 0 μg (controle)	➤ Não foram observadas alterações clínicas.
Controle B/ 0 μg (controle)	➤ Não foram observadas alterações clínicas.
Cobaia 1/ 11,627 μg	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de discreto halo hemorrágico com sangramento ativo. ➤ Após 12 horas: presença de extenso eritema, associado a edema, com formação de discreta escara em halo hemorrágico, e dor moderada no local da aplicação. ➤ Após 24 horas: Manutenção da escara formada, com melhora do eritema e dor local discreta ➤ Observada estabilidade da lesão local e sem sinais clínicos sistêmicos. ➤ Eutanásia após 72 horas.
Cobaia 2/ 12,789 μg	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de discreto halo hemorrágico com sangramento ativo. ➤ Após 12 horas: presença de eritema, com formação de discreta escara em halo

	<p>hemorrágico, e dor moderada no local da aplicação.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Após 24 horas: Manutenção da escara formada, com melhora do eritema e dor local discreta ➤ Observada estabilidade da lesão local e sem sinais clínicos sistêmicos. ➤ Eutanásia após 72 horas.
Cobaia 3/ 14,068 µg	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de discreto halo hemorrágico com sangramento ativo. ➤ Após 12 horas: presença de eritema, com formação de discreta escara em halo hemorrágico, e dor moderada no local da aplicação. ➤ Após 24 horas: Manutenção da escara formada, com melhora do eritema e dor local discreta ➤ Observada estabilidade da lesão local e sem sinais clínicos sistêmicos ➤ Eutanásia após 72 horas.
Cobaia 4/ 15,475 µg	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de discreto halo hemorrágico. ➤ Após 12 horas: presença de eritema, estabilidade de halo hemorrágico, e dor moderada no local da aplicação. ➤ Após 24 horas: Manutenção da escara formada, com melhora do eritema e dor local discreta ➤ Observada estabilidade da lesão local e sem sinais clínicos sistêmicos. ➤ Eutanásia após 72 horas.
Cobaia 5/ 17,795 µg	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de halo hemorrágico.

	<ul style="list-style-type: none">➤ Após 12 horas: presença de eritema com formação de escara em halo hemorrágico, animal apresentou dor moderada no local da aplicação.➤ Após 24 horas: Manutenção da escara formada, com melhora do eritema. Animal com dor local discreta.➤ Observada melhora da lesão local, com diminuição da área de escara e halo hemorrágico após 72 horas, sem sinais clínicos sistêmicos.➤ Eutanásia após 72 horas.
Cobaia 6/ 18,725 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de discreto halo hemorrágico com sangramento ativo.➤ Após 12 horas: presença de eritema com formação de discreta escara em halo hemorrágico, e dor moderada no local da aplicação.➤ Após 24 horas: Manutenção da escara formada, com melhora do eritema. Animal com dor local discreta.➤ Observada melhora da lesão local, com diminuição da área de escara e halo hemorrágico após 72 horas, sem sinais clínicos sistêmicos.➤ Eutanásia após 72 horas.
Cobaia 7/ 21,533 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de eritema.➤ Após 12 horas, apresentou prostração.➤ Óbito após aproximadamente 24 horas.

Cobaia 8/ 24,762 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de halo hemorrágico extenso.➤ Após 12 horas: dor local moderada, mudança de comportamento e postura, prostração, com queda na ingestão de alimentos e água.➤ Óbito após aproximadamente 24 horas.
Cobaia 9/ 28,477 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de halo hemorrágico extenso.➤ Após 12 horas: dor local moderada, mudança de comportamento e postura, prostração, com queda na ingestão de alimentos e água.➤ Animal clinicamente desidratado e intensamente prostrado.➤ Óbito após aproximadamente 24 horas.
Cobaia 10/ 29,995 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de halo hemorrágico.➤ Após 12 horas: dor local moderada, mudança de comportamento e postura, prostração, com queda na ingestão de alimentos e água.➤ Óbito após aproximadamente 24 horas.
Cobaia 11/ 47,985 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de halo hemorrágico e eritema.➤ Após 12 horas: dor local moderada, mudança de comportamento e postura, prostração, com queda na ingestão de alimentos e água.➤ Óbito após aproximadamente 23 horas.
Cobaia 12/ 76,775 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno e presença de halo hemorrágico com sangramento ativo.

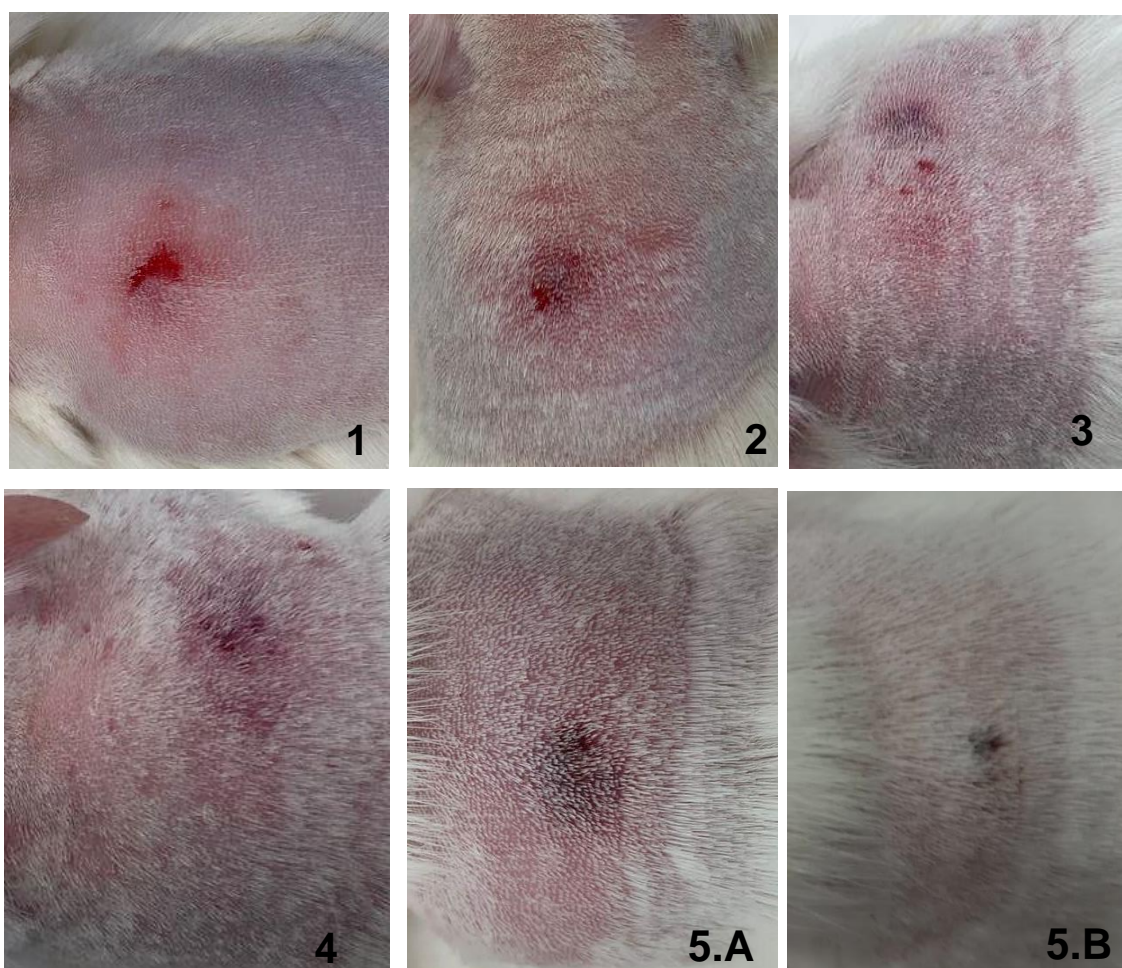
	<ul style="list-style-type: none">➤ Após 12 horas: dor local moderada, halo hemorrágico com sangramento ativo, mudança de comportamento e postura, prostração intensa e com queda na ingestão de alimentos e água.➤ Óbito após aproximadamente 24 horas.
Cobaia 13/ 105 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno.➤ Após 12 horas: presença de edema discreto na região interescapular, dor local moderada, mudança de comportamento e postura, com queda na ingestão de alimentos e água, e fezes ficaram pastosas.➤ Após 24 horas: quadro de prostração intensa, dor local intensa e manutenção dos demais sinais.➤ Óbito em aproximadamente 30 horas após envenenamento
Cobaia 14/ 140 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno.➤ Após 12 horas: apresentou dor local moderada, mudança de comportamento e postura, com queda na ingestão de alimentos e água, e fezes ficaram pastosas.➤ Após 24 horas: notou-se eritema local discreto, prostração intensa, e manutenção dos demais sinais.➤ Óbito em aproximadamente 30 horas após envenenamento
Cobaia 15/ 210 µg	<ul style="list-style-type: none">➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno.➤ Após 12 horas: presença de edema discreto no local de aplicação, aparecimento de ferida discreta, associado a dor local, mudança de

	<p>comportamento e postura, com queda na ingestão de alimentos e água.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Após 24 horas: prostração intensa, dor local intensa, aumento da ferida na região interescapular e manutenção dos demais sinais clínicos. ➤ Após aproximadamente 30 horas, o animal veio à óbito.
Cobaia 16/ 350 µg	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Primeiras horas após a inoculação: prurido no local de aplicação do veneno. ➤ Após 12 horas: mudança de comportamento e postura, com queda na ingestão de alimentos e água e fezes pastosas. ➤ Após 24 horas: prostração intensa e piora da dor local. ➤ Após aproximadamente 30 horas, o animal veio à óbito.

Todos os animais, com exceção aos animais desafiados somente com solução de cloreto de sódio 0,9% (controle A e controle B), apresentaram prurido no local de aplicação, poucos minutos após a inoculação do veneno.

Em casos mais leves, as picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* podem simplesmente causar uma discreta reação urticariforme. Nos casos mais graves, a picada inicial é indolor, mas, após 2 a 8 horas surge dor aguda e penetrante que se transforma progressivamente em uma sensação de queimação. Pode haver dois pequenos pontos no local da picada. A área da picada fica pálida e, essa, imediatamente ao redor da picada torna-se vermelha e edematosa, com dor leve a intensa secundária a vasoespasmo e isquemia. A bolhas podem se formar e, ao longo de vários dias após a picada, geralmente há uma coloração azul-violeta, dura, estrelada, centro afundado. De acordo com Martins *et al.* (2022), a propagação pode ocorrer gravitacionalmente, seguindo posteriormente, a descamação, o que também foi observado no presente estudo.

Conforme demonstrado na figura 6, ocorreram alterações locais (eritema e halo hemorrágico após injeção intradérmica das menores doses veneno de *Loxosceles intermedia* em cobaias. Não foram observadas a ocorrência de halo hemorrágico dentre os animais que receberam as maiores concentrações de veneno de *L. intermedia*. Porém, nesses se observaram sinais sistêmicos mais graves, como diarreia e óbito precoce. Estes resultados estão de acordo aos estudos feitos por Gomez *et al.* (2001), que apontaram as reações sistêmicas de maior gravidade causados pelo veneno de aranha-marrom. Possivelmente, feridas necróticas poderiam manter as toxinas do veneno concentradas no local da picada, já as lesões menores permitem que haja maior absorção do veneno pelo organismo (GOMEZ *et al.*, 2001).





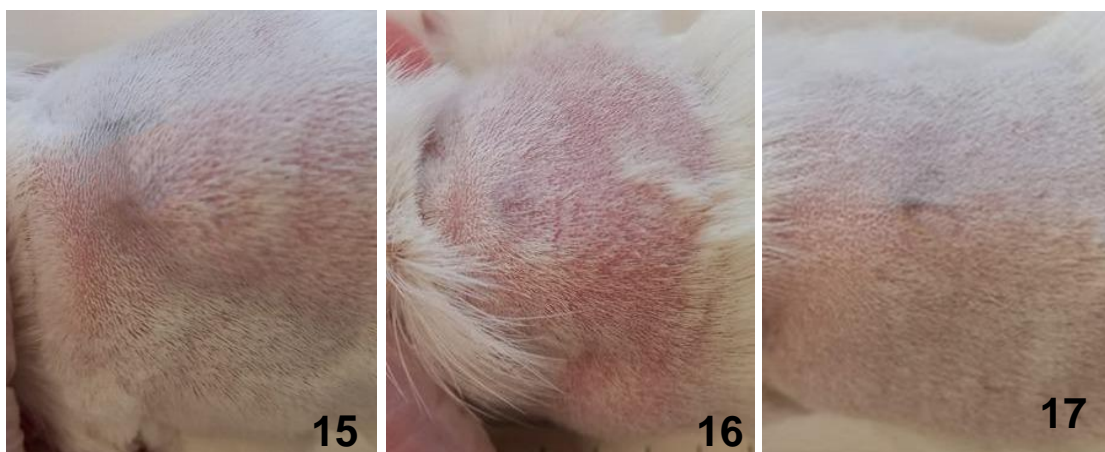


Figura 6. Alterações locais (eritema e halo hemorrágico após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia* em cobaias. **1:** Cobaia 1; **2:** Cobaia 2; **3:** Cobaia 3; **4:** Cobaia 4; **5.1:** Cobaia 5, 24 horas após o envenenamento; **5. 2:** Cobaia 5, 72 horas após o envenenamento, apresentando melhora da lesão. **6:** Cobaia 6; **7:** Cobaia 7; **8:** Cobaia 8; **9:** Cobaia 9; Cobaia; **10:** Cobaia 10; **11:** Cobaia 11; **12:** Cobaia 12; **13:** Cobaia 13; **14:** Cobaia 14; **15:** Cobaia 15; **16:** Cobaia 16; **17:** Controle 1.

4.2. Hemograma

4.2.1. Eritrograma

Alguns animais vieram a óbito anteriormente ao período de coleta determinado, por esse motivo, não foi possível realizar coletas de amostras de alguns os animais em todos estes momentos especificados.

Por meio da análise dos hemogramas, após o envenenamento experimental, foi possível observar a ocorrência de alterações sanguíneas na maioria dos animais. No eritrograma, foram observadas variações no número de eritrócitos / μL de sangue (Figura 7), de hemoglobina g/dL (Figura 8), do volume globular % (Figura 9) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) %, índice hematimétrico utilizado para classificação de anemia (Figura 10).

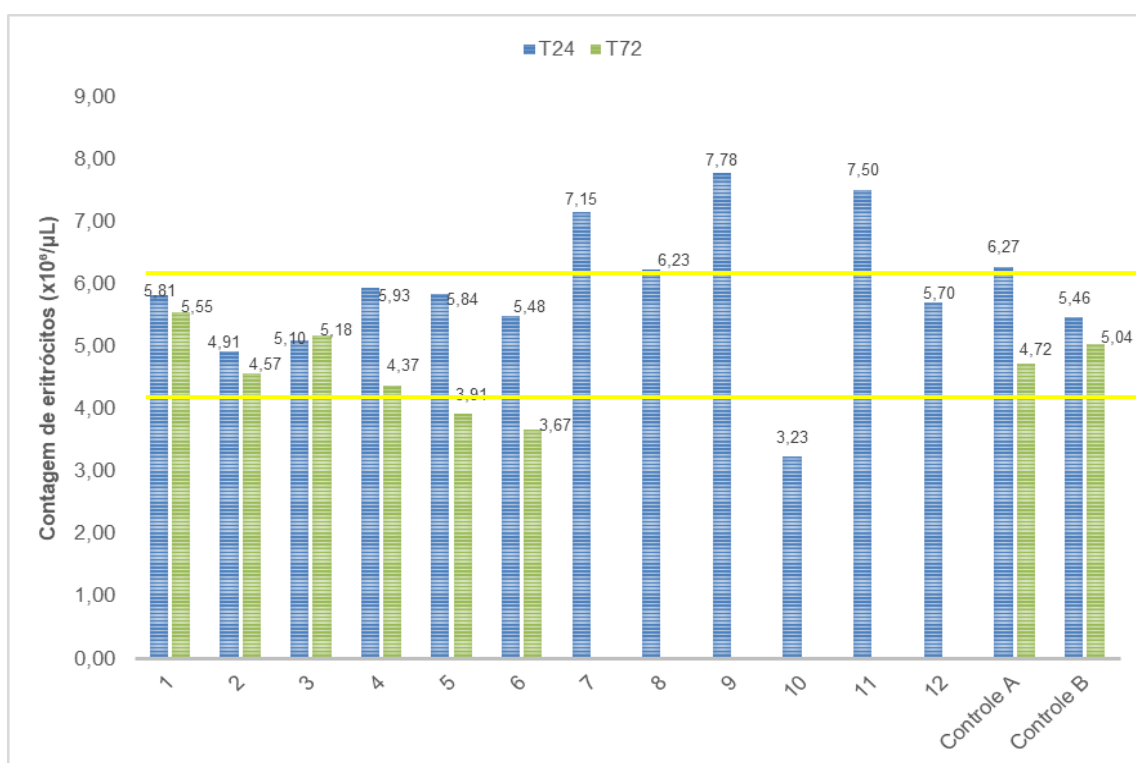


Figura 7. Número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$), 24 horas (em azul) e 72 horas (em verde) após aplicação intradérmica experimental de veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência ($4,1 - 6,1 \times 10^6/\mu\text{L}$ de sangue) (entre as linhas amarelas).

A determinação desses parâmetros é muito importante para a avaliação do estado geral de saúde dos animais, especialmente sobre a ocorrência de anemia ou policitemia. O número de eritrócitos na cobaia varia entre 4,1 a 6,1 x 10³ /μL de sangue (THRALL *et al.*, 2017). Hemoglobina e volume globular, normalmente, variam entre 11,6 e 16,9 g/dL e 39 a 55%, respectivamente, o que também foi descrito por vários autores (MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1994; HEIN e HARMANN, 2003; SILVA *et al.*, 2005).

Os animais 1 (11,627 μg), 2 (12,789 μg), e 4 (15,475 μg) apresentaram no T72 (72h após a injeção de veneno), uma discreta diminuição do número de eritrócitos, bem como os animais usados como testemunha (controles A e B); diminuição essa sem significado clínico, já que os valores ficaram dentro do limite de normalidade estabelecido por Thrall *et al.* (2017), conforme demonstrado na figura 7. Possivelmente, essa alteração seja decorrente do curto intervalo entre coletas e do volume coletado. Todavia, nos animais 5 (17,795 μg) e 6 (18,725 μg), essa diminuição, também observada no T72, demonstra que o número de eritrócitos ficou abaixo do limite mínimo estabelecido para a espécie. Nesses mesmos animais, além da diminuição do número de eritrócitos houve diminuição da concentração de hemoglobina e do volume globular, caracterizando um quadro de anemia, que pode ser causado por destruição dos eritrócitos (hemólise) ou aumento da perda sanguínea (por hemorragia), situações que ocorrem no envenenamento sistêmico causado pelo veneno da aranha *Loxosceles*. Também é possível observar que o animal 10 (29,995 μg), já no T24 (24 horas após envenenamento), apresentou uma diminuição significativa do número de eritrócitos.

Tradicionalmente, a anemia é classificada pelo volume corpuscular médio (VCM) e pela concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), parâmetro esse, utilizado nessa pesquisa. Em relação ao tamanho dos eritrócitos pode ser classificada como normocítica, microcítica e macrocítica, e, em relação a concentração de hemoglobina dentro dos eritrócitos, pode ser classificada como normocrômica ou hipocrômica. Ressalta-se que anemia hiperocrômica não existe, mas quando o CHCM falsamente aparece aumentado, isso pode ser decorrente de hemólise, lipemia ou presença de corpúsculo de Heinz (THRALL *et al.*, 2017). O aumento de CHCM foi visto no animal 10 (29,995 μg), provavelmente por hemólise, e será discutido posteriormente.

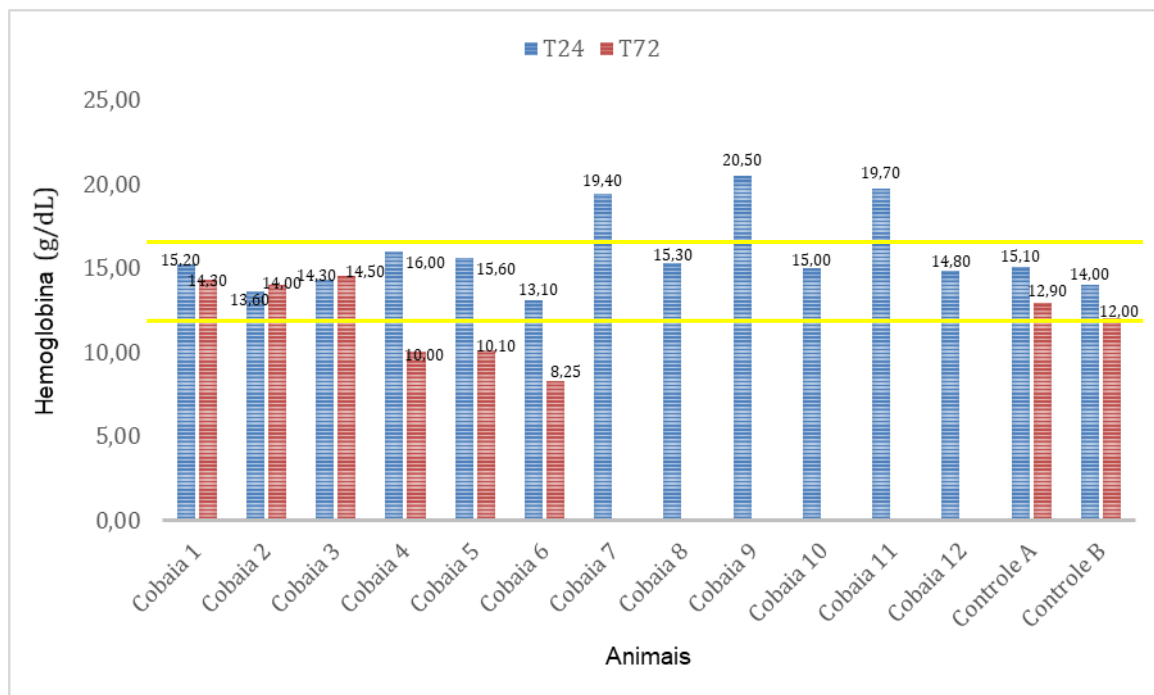


Figura 8. Principais variações de hemoglobina (g/dL), 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após aplicação intradérmica experimental de veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (11,6-16,9 g/dL) (entre as linhas amarelas).

As cobaias 4 (15,475 µg), 5 (17,795 µg), 6 (18,725 µg) apresentaram quedas importantes na concentração de hemoglobina 72 horas após o envenenamento (Figura 7). Além disso, esses mesmos animais e, a cobaia 10 (29,995 µg), mostraram redução de VG (Figura 8). Os animais 4, 5 e 6 evoluíram para quadro de anemia ao longo das primeiras 72 horas após a exposição ao veneno, enquanto o animal 10 apresentou intensa anemia já nas primeiras 24 horas, possivelmente com destruição das hemácias já que a concentração de hemoglobina estava dentro do limite de normalidade.

Outros fatores importantes são o número de coletas, a proximidade entre elas e o volume coletado. Percebe-se nos animais usados como controle (A e B), uma diminuição da hemoglobina e VG, possivelmente por esses fatores, sem significado clínico.

Nos animais 7 (21,5335 µg), 9 (28,477 µg) e 11 (47,985 µg) foi observado um aumento no número de eritrócitos (Figura 7), na hemoglobina (Figura 8), e no VG, (Figura 9). Esse aumento foi devido a não ingestão de água com conseqüente desidratação das cobaias após o envenenamento loxoscélico, levando a uma policitemia relativa (THRALL et al., 2017).

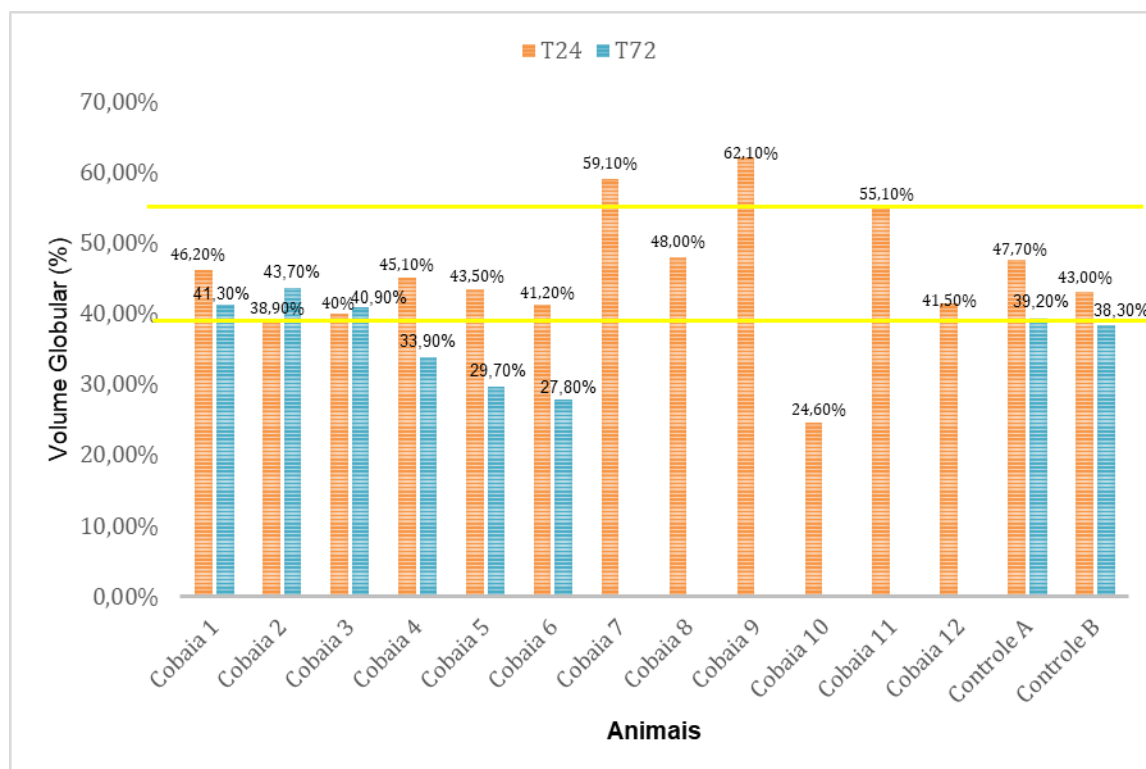


Figura 9. Valores de Volume globular (%), 24 horas (em laranja) e 72 horas (em azul) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (39-55%) (entre as linhas amarelas).

Outra importante alteração observada em algumas cobaias foi o aumento significativo da CHCM no animal 10 (29,995 μg) e, discreto no animal 12 (76,775 μg), conforme demonstrado na figura 10. Segundo Thrall *et al.* (2017), o aumento de CHCM pode ocorrer artificialmente quando existem algumas anormalidades do sangue que podem resultar em hemólise grave, podendo ser resultante da lise de eritrócitos induzida por artefatos durante a coleta de sangue. Portanto, caso o hematócrito esteja normal, como ocorre no animal 12, é possível presumir que esta hemólise seja apenas artefato de coleta. Porém, em casos de anemias causadas por hemólise intravascular, também é possível notar esse aumento de CHCM, tipicamente associada à hemoglobinúria. Em humanos e suínos, uma das principais manifestações sistêmicas do loxoscelismo é a ocorrência de anemias hemolíticas (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006, THRALL *et al.*, 2017).

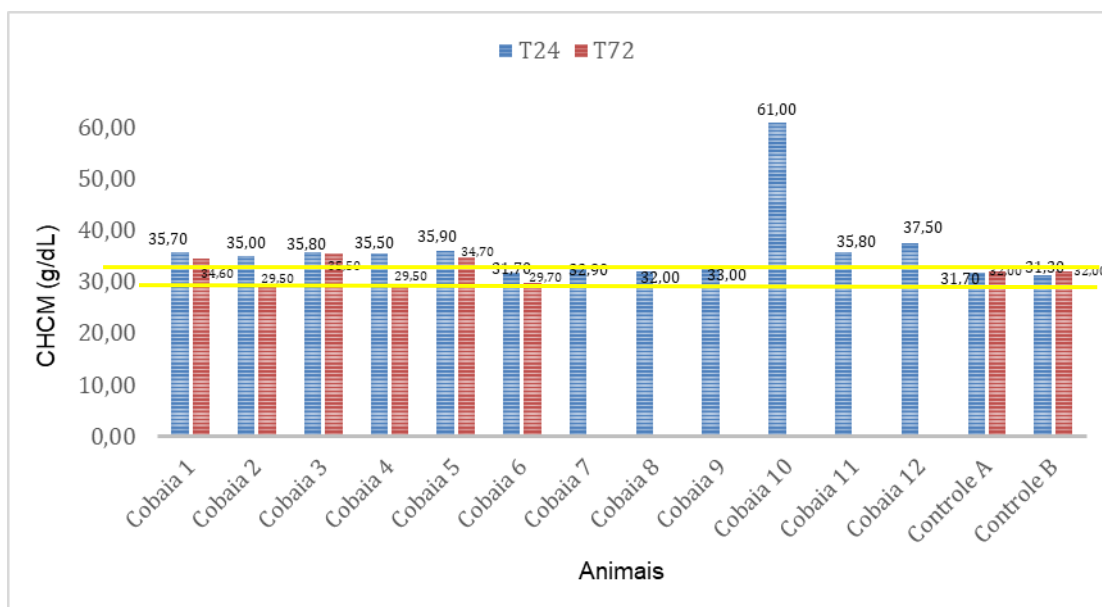


Figura 10: Valores de CHCM g/dL, 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (29-32 g/dL) (entre as linhas amarelas).

A hemólise eritrocitária foi associada ao envenenamento loxoscélico em modelos *in vitro* desenvolvidos por Futrell *et al.* (1979). Em camundongos, as toxinas também são capazes de causar hemólise intravascular, com liberação de citocinas semelhantes às observadas em choques endotóxicos (TAMBOURGI *et al.*, 1998b). O mecanismo que provoca a susceptibilidade do sistema complemento foi elucidado posteriormente por Tambourgi *et al.* (2000, 2002), que mostraram que as toxinas são capazes de ativar também uma via imunológica alternativa nos eritrócitos de humanos, com ativação de metaloproteinase endógena. Isso causa a remoção das glicoforinas das membranas, possivelmente alterando a assimetria da membrana dos eritrócitos. Em coelhos e cobaias, em estudos anteriores, não foram observadas reações hemolíticas. O fato de a resposta ser variável entre diferentes espécies, pode estar relacionada às diferenças na composição e posicionamento das estruturas das membranas (Barreto *et al.*, 2007)

Apesar de estudos anteriores relatarem a inócorência de anemias hemolíticas em cobaias após o envenenamento loxoscélico, alguns dos animais deste presente estudo apresentaram quadros anêmicos, sendo que o animal 10 (29,995 µg), apresentou aumento significativo de CHCM, o que poderia indicar hemólise grave. Portanto, são necessários novos estudos para esclarecimentos.

À leitura do esfregaço sanguíneo, todos os animais, incluindo os controles, apresentaram anisocitose, policromasia e ocorrência de equinócitos. Usualmente, a anisocitose está associada à uma variação anormal no tamanho dos eritrócitos, porém, em cobaias, mesmo em indivíduos saudáveis, os eritrócitos possuem tamanhos desiguais que geram anisocitose (THRALL *et al.*, 2017; THAMER *et al.*, 2019). A policromasia está associada à liberação de eritrócitos jovens e formação dos equinócitos está associada à crenação artefactual dos eritrócitos, mas também tem sido associada a doenças renais, linfomas e a acidentes crotálicos (THRALL *et al.*, 2017). Portanto, não é possível atribuir valor clínico a esses achados.

4.2.2. Leucograma

O número de leucócitos presentes na circulação sanguínea após o envenenamento é variável e dependente do tempo de coleta, bem como a dose de veneno aplicada. Essa variação se dá através da ativação do sistema complemento provocada pelos efeitos proteolíticos do veneno de *L. intermedia*, que causam a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos ou polimorfonucleares (PMN), para o local de inoculação, o que gera um decréscimo transitório de leucócitos na circulação sanguínea. Em coelhos, nas primeiras 24 horas após o envenenamento, observou-se leucopenia, associada à neutropenia. Posteriormente, cerca de 72 horas após o envenenamento, ocorreu leucocitose por neutrofilia, decorrente do aumento do número de células mielóides na medula óssea. E, cinco dias após o envenenamento houve a normalização do número de leucócitos (SILVA *et al.*, 2003, TAVARES *et al.*, 2004; MCGLASSON *et al.*, 2007; MALAQUE *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2014; MARTINS, 2014; HUEZA e DUARTE, 2020).

A figura 11 mostra a variação o número de leucócitos/ μ L de sangue após 24 horas (T24) e 72 horas (T72). Pode-se observar que, somente nos animais 4 (15,475 μ g) e 6 (18,725 μ g), houve um aumento na contagem leucocitária no período entre as coletas (24 e 72h). Esse aumento foi mais significativo no animal 6, porém, se mantendo dentro do limite de referência para a espécie estudada. Contudo, após as primeiras 24 horas do envenenamento foi possível observar a ocorrência de leucocitose em dois animais desafiados com diferentes dosagens de veneno - nas

cobaias 8 (24,762 μg) e 12 (76,775 μg) com valores totais de leucócitos de 20.800 e 17.813/ μL de sangue, respectivamente.

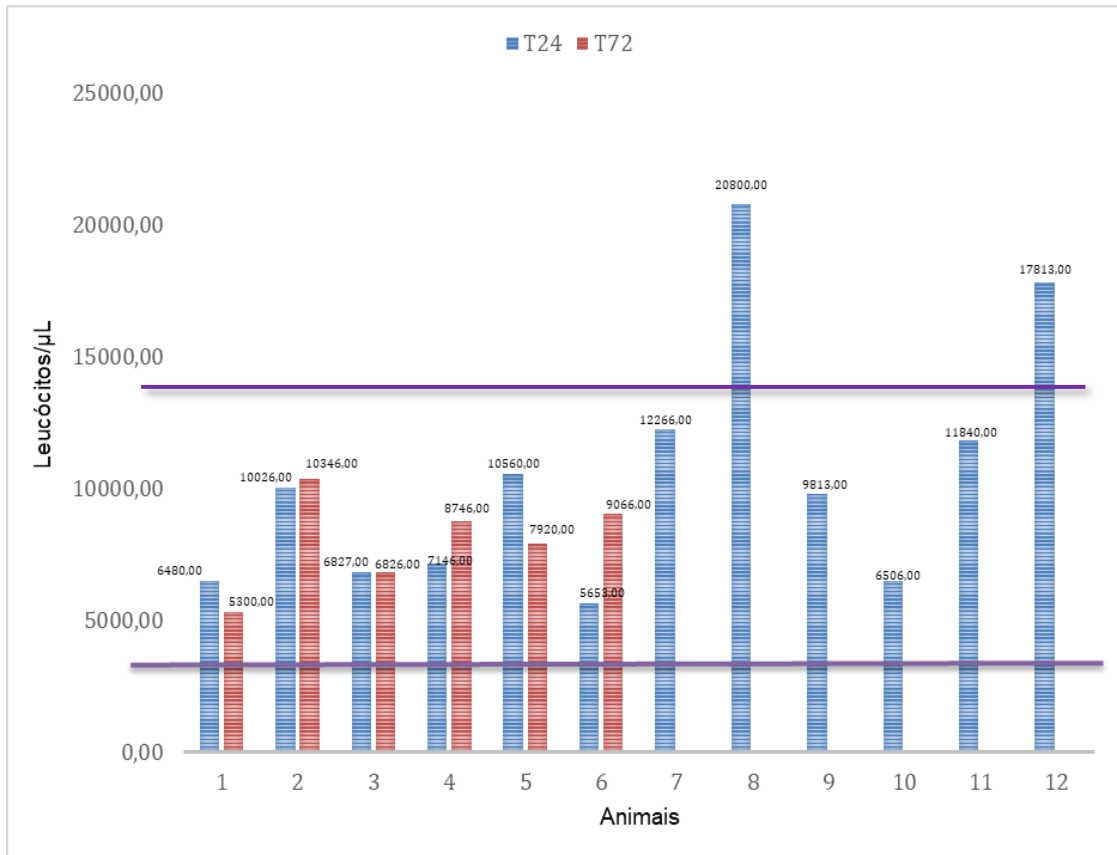


Figura 11: Número de leucócitos/ μL de sangue, 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (2.900 – 14.100 leucócitos/ μL de sangue) (entre as linhas roxas).

Nos animais 1 (11,627 μg) e 5 (17,795 μg), notou-se um decréscimo leucocitário, mas não foi identificada leucopenia em nenhuma das cobaias, diferente de Silva *et al.* (2003) que relataram uma leucopenia intensa em coelhos, 24 horas após a inoculação do veneno de *L. intermedia*, com posterior normalização do número de leucócitos cinco dias após o envenenamento. Sabe-se que o número de leucócitos na circulação sanguínea é variável e dependente do tempo de coleta após o envenenamento, da dose do veneno injetada, e, em especial, do modelo experimental estudado (nesse caso, a cobaia), que responde de forma diferente ao modelo de Silva *et al.* (2003), que foi o coelho. Salienta-se que entre os vários motivos, o desenvolvimento do quadro clínico, como a não formação de área dermonecrotica e

estabelecimento de um quadro sistêmico de maior gravidade, é extremamente importante.

Na cobaia, os valores de referência do número de leucócitos, ficam entre 2.900 a 14.400/ μ l de sangue (MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1994; HEIN e HARMANN, 2003; SILVA *et al.*, 2005). Assim como nos humanos, ratos e camundongos, os linfócitos são as células predominantes na contagem leucocitária diferencial das cobaias (THRALL *et al.*, 2017; FITRIA *et al.*, 2021). Porém, foi possível notar uma significativa neutrofilia em todos os animais que receberam veneno de *L. intermedia*, com exceção das cobaias 1 (11,627 μ L) e 5 (17,795 μ g), gerando um desvio da relação normal entre linfócitos e neutrófilos observada nessa espécie.

Os neutrófilos são as principais células envolvidas na resposta inflamatória aguda. As citocinas liberadas migram para a medula óssea, provocando o aumento da taxa liberação e proliferação de neutrófilos. O resultado é um aumento da presença de neutrófilos na corrente sanguínea. Dessa forma, a relação neutrófilos-linfócitos (RNL) pode ser utilizada como marcadora do estado inflamatório do indivíduo (ZAHOREC, 2001; THRALL *et al.*, 2017). A sua inversão pode ser interpretada como resposta imunológica ao veneno, em que há o deslocamento do *pool* marginal de neutrófilos para a circulação geral e de mobilização da reserva medular (JAIN, 1993). Diante disso, é possível apontar que a inversão da RNL em grande parte das cobaias se deve ao processo inflamatório causado pelo veneno de *L. intermedia*, sendo mais grave, principalmente, nos animais que receberam dosagens mais elevadas. A figura 11 mostra a distribuição leucocitária dos valores relativos e absolutos.

No animal 5 (17,795 μ g), após 72 horas, nota-se a diminuição da contagem de neutrófilos, e a presença de metamielócitos, que são células heterófilas imaturas, caracterizando um desvio à esquerda devido a lesão inflamatória mais agressiva (THRALL *et al.*, 2017). Não foram observadas alterações na contagem de eosinófilos, monócitos e basófilos em todos os animais estudados, resultado semelhante ao relatado por Polli (2020), em coelhos.

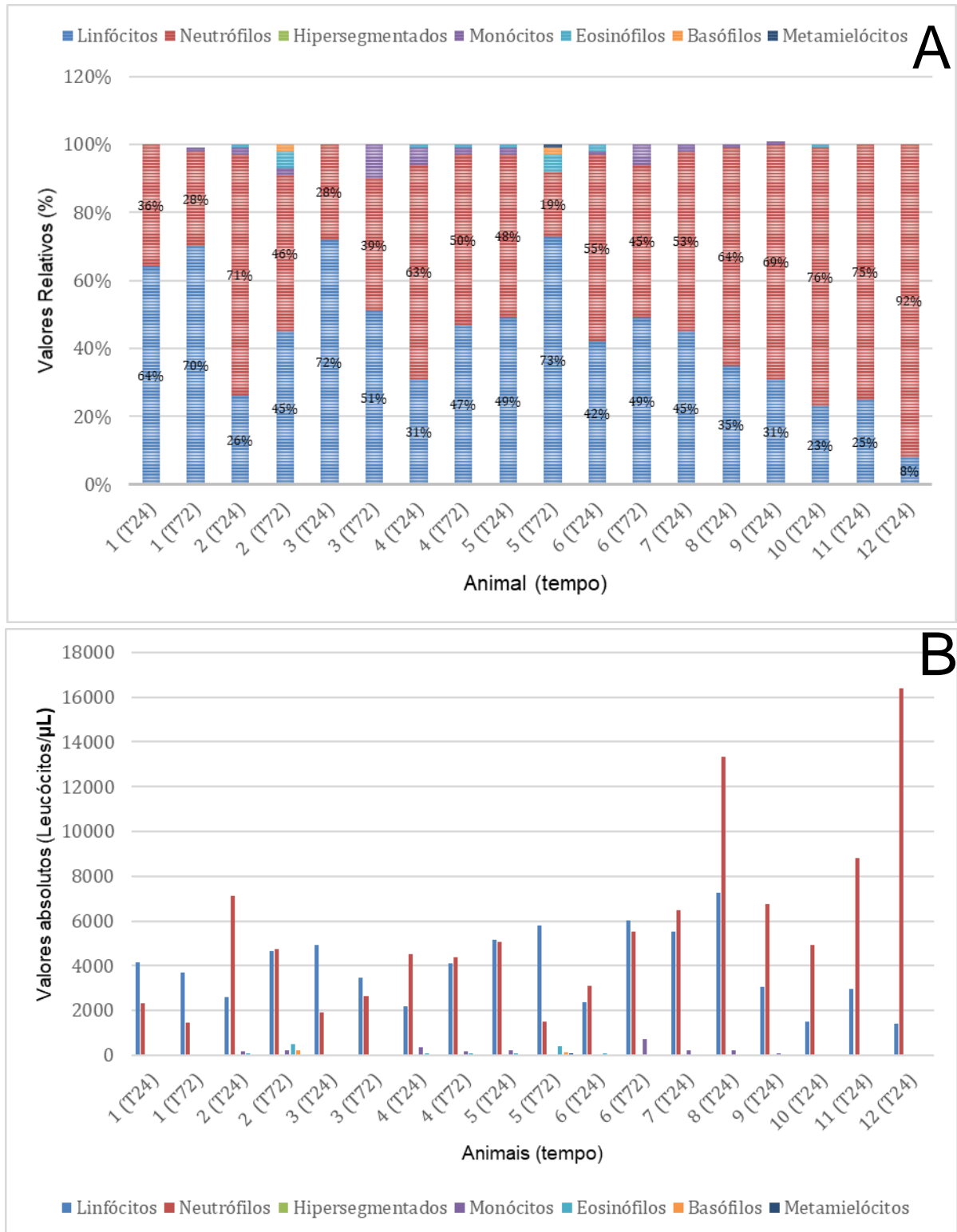


Figura 12. A: Valores relativos de leucócitos (%), 24 horas e 72 horas após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias. **B:** Valores absolutos de leucócitos/μL entre 24 e 72 horas após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias.

Por fim, à análise do esfregaço sanguíneo foi possível relatar a presença de linfócitos reativos nos animais 2 (12,789 µg), 5 (17,795 µg), 6 (18,725 µg), 8 (24,762 µg) e, em um dos animais controle. Os linfócitos reativos, de modo geral, podem estar presentes, principalmente, em infecções virais e parasitárias e processos inflamatórios (RIOS, 2002). Além disso, um achado comum na maioria dos animais foi a existência de linfócitos de tamanhos variados (grandes e pequenos). Essa alteração é um padrão observado normalmente em cobaias. Cerca de 3 a 4% dos leucócitos no sangue periférico desses roedores são linfócitos grandes que contêm uma inclusão citoplasmática, denominada corpúsculo de Kurloff, sendo um achado sem importância clínica (QUESENBERRY *et al.*, 2012; THRALL *et al.*, 2017).

4.2.3. Plaquetograma

Um dos efeitos de maior severidade causados pelo veneno de aranha marrom é a coagulação intravascular que ocorre no início do curso de desenvolvimento das lesões cutâneas (FUTRELL, 1992; ELSTON *et al.*, 2000; OSPEDAL *et al.*, 2002). O veneno de *Loxosceles* é capaz de promover elevação de fibrinogênio, significativa diminuição do fator VII da coagulação, agregação plaquetária e trombocitopenia horas após o envenenamento, devido ao consumo intenso de plaquetas no local da ferida, e também através de uma possível ação direta e transitória do veneno na medula óssea (SILVA *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2009).

Em estudos realizados por Kurpiewski *et al.* (1981) em modelos *in vitro* foi demonstrada a ação da esfingomielinase D diretamente ou indiretamente sobre as plaquetas, causando agregação e trombocitopenia, o que sugere um envolvimento dessas toxinas na trombocitopenia observada *in vivo*. Em humanos, a ocorrência de casos de loxoscelismo com presença de CID é considerada uma manifestação clínica rara (IBSTER e FAN, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011; VETTER e SWANSON, 2022).

A ocorrência de trombocitopenia foi observada em sete dos animais inoculados com diferentes dosagens de veneno de *L. intermedia* – animais 1 (11,627 µg), 5 (17,795 µg), 7 (21,533 µg), 8 (24,762 µg), 9 (28,477 µg), 10 (29,995 µg) e 11 (47,985 µg), o que pode ser conferido na Figura 13.

A cobaia 5 (17,795 μg) apresentou discreta trombocitopenia 24 horas após o envenenamento, mas, 72 horas após, essa alteração não foi mais observada. As cobaias, 1 (11,627 μg), 7 (21,533 μg), 8 (24,762 μg), 9 (28,477 μg), 10 (29,995 μg) e 11 (47,985 μg) também apresentaram trombocitopenia após 24 horas.

A contagem plaquetária foi realizada através de microscopia óptica utilizando o esfregaço sanguíneo. Segundo Quesenberry *et al.* (2012), o intervalo de referência de concentração plaquetária para a espécie é de 250.000 a 850.000 plaquetas/ μL .

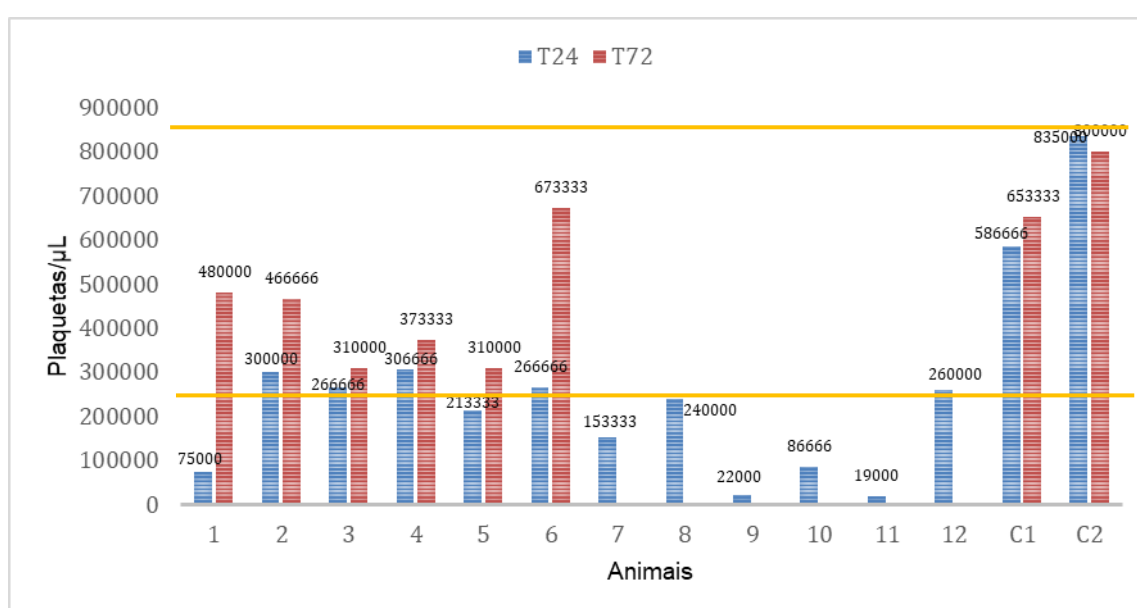


Figura 13. Número de plaquetas/ μL de sangue, 24 horas (em azul) e 72 horas (em vermelho) após o envenenamento experimental pelo veneno da aranha *Loxosceles intermedia* em cobaias, e a demarcação do intervalo de referência (250.000 a 850.000 plaquetas/ μL) (entre as linhas amarelas).

Nos esfregaços sanguíneos das cobaias 4 (15,475 μg), 7 (21,533 μg), 8 (24,762 μg), 10 (29,995 μg) e 11 (47,985 μg), observou-se a presença agregados plaquetários. Esta alteração, geralmente não possui um significado clínico e ocorre em amostras de sangue coletadas com EDTA a 10%. Ressalta-se que o animal 4, apesar de a presença dos agregados, apresentou número plaquetário dentro dos limites de normalidade para a espécie. Mas, nos animais 7 e 8, essa trombocitopenia poderia ser verdadeira ou uma pseudoplaquetopenia. Já, nas cobaias, 1 (11,627 μg), 9 (28,477 μg), 10 (29,995 μg) e 11 (47,985 μg), foi observada uma acentuada

trombocitopenia, com valores de 75.000, 22.000, 86.666 e 19.000 plaquetas/ μ L, respectivamente.

Ademais, outra alteração que pôde ser observada em grande parte dos animais, incluindo anteriormente à aplicação intradérmica do veneno de *L. intermedia*, e também nos controles, foi a presença de plaquetas ativadas. Esta alteração não está relacionada aos efeitos do envenenamento, estando, provavelmente, relacionada às lesões endoteliais provocadas durante a coleta das amostras de sangue das cobaias. Deve-se ser ressaltado que as plaquetas são elementos corpusculares desprovidos de núcleos, altamente sensíveis a qualquer alteração física ou química do sangue ou sistema cardiovascular, apresentando rápida resposta, para minimizar danos vasculares, modular respostas alérgicas e inflamatórias. Também servem para avaliar a hemostasia primária que envolve a interação entre a parede dos vasos. Portanto, quando há uma lesão vascular, além da vasoconstrição, há ativação de plaquetas e fatores para sua adesão e agregação para agir na reparação do dano.

4.3. Perfil Bioquímico

4.3.1. Biomarcadores renais

Uma das principais manifestações do loxoscelismo sistêmico é a insuficiência renal aguda, que é apontada como a principal causa de óbito (DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; IBSTER e FAN, 2011; MALAQUE *et al.*, 2011; GREMSKI *et al.*, 2014; VETTER e SWANSON, 2022). Ocorre pela ação direta do veneno, provocando edema glomerular e nefrose tubular, e através do depósito de hemoglobina nos túbulos renais advindos da intensa hemólise intravascular (MALAQUE *et al.*, 2002; TAMBOURGI *et al.*, 2010; MALAQUE *et al.*, 2011).

Para realização do acompanhamento nefrológico das cobaias após o envenenamento experimental por veneno de *L. intermedia*, foram realizadas as dosagens séricas de creatinina, ureia, fósforo e SDMA. Os resultados encontrados estão descritos a seguir, na tabela 2. Os valores de referência para a espécie, estão discriminados na tabela 3. Além disso, foram realizadas as urinálises, que serão discutidas posteriormente.

Tabela 2: Concentrações séricas de creatinina, ureia, fósforo e SDMA de cobaias, 24 horas (T24) e 72 horas (T72) após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*

Animal (Dose)	Creatinina (mg/dL) (T24)	Ureia (mg/dL) (T24)	Fósforo (mg/dL) (T24)	SDMA (µg/dL) (T24)	Creatinina (mg/dL) (T72)	Ureia (mg/dL) (T72)	Fósforo (mg/dL) (T72)	SDMA (µg/dL) (T72)
Cobaia 1 (11,627 µg)	1,04	33,8	9,60	8	0,68	40,8	7,23	17
Cobaia 2 (12,789 µg)	0,67	44,1	6,60	9	0,60	44,9	7,65	9
Cobaia 3 (14,068 µg)	0,58	43,5	5,68	9	0,43	44,4	5,79	6
Cobaia 4 (15,475 µg)	0,68	42,1	12,12	14	0,62	44,7	7,19	15
Cobaia 5 (17,795 µg)	-	51	-	8	0,42	51	9,58	-
Cobaia 6 (18,725 µg)	0,76	51,2	9,03	11	0,49	51,2	8,01	8

Cobaia 7 (21,533 µg)	-	20,4	-	-	-	-	-	-
Cobaia 8 (24,762 µg)	0,78	39,5	11,20	15	-	-	-	-
Cobaia 9 (28,477 µg)	1,22	84,4	24,17	17	-	-	-	-
Cobaia 10 (29,995 µg)	0,51	48,9	12,17	9	-	-	-	-
Cobaia 11 (47,985 µg)	-	69,6	-	-	-	-	-	-
Cobaia 12 (76,775 µg)	1,16	67,3	29,58	36	-	-	-	-
Controle A	0,49	32,4	5,95	13	-	46,7	10,77	5
Controle B	0,39	37	7,67	14	-	44,8	8,77	8

Tabela 3: Intervalo de referência para valores séricos de creatinina, ureia e fósforo em cobaias (*Cavia porcellus*)

Analito	Intervalo de Referência*
Creatinina	0 – 0,87 mg/dL
Ureia	20 - 61,93 mg/dL
Fósforo	3,2 – 21,6 mg/dL

*Fonte: MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1994; HEIN e HARMANN, 2003

Luciano *et al.* (2004) comprovaram a deposição e ligação de toxinas do veneno de aranha marrom ao longo de estruturas glomerulares e tubulares e, sua consequente citotoxicidade nos rins de camundongos. Os distúrbios hemolíticos, como a anemia hemolítica e a CID, bem como a nefrotoxicidade secundária às lesões dermonecroticas também foram postulados como processos patológicos que podem levar à falência renal (FUTRELL, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1995; LUNG e MALLORY, 2000). Porém, como os estudos foram realizados em camundongos, que são modelos animais que não desenvolvem as lesões dermonecroticas, torna-se questionável

apontar a nefrotoxicidade como uma complicação secundária à dermonecrose (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004, CHAIM *et al.*, 2006).

Define-se por injúria renal aguda (IRA), a perda, de forma súbita, da função renal, provocando acúmulo sérico de compostos nitrogenados, acompanhado ou não da diminuição da diurese (COSTA *et al.*, 2003). O comprometimento das funções renais de vítimas de picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* pode ser demonstrado por meio de sinais clínicos e resultados laboratoriais, que podem incluir o aumento da creatinina e ureia no sangue e alterações na urina, como proteinúria, hematúria e hemoglobinúria, além do choque (WILLIAMS *et al.*, 1995; BEY *et al.*, 1997; FRANÇA *et al.*, 2002; LUNG e MALLORY, 2000).

A diminuição da taxa de filtração glomerular (TGF) é o melhor indicador de insuficiência renal e parâmetros como a ureia e creatinina, por serem livremente filtrados pelo glomérulo, têm sido comumente utilizados para estimar a TFG, ambos aumentando de forma inversamente proporcional à sua queda. No entanto, essas alterações só se tornam evidentes quando mais de 75% dos néfrons estiverem afuncionais (THRALL *et al.*, 2017). Foi possível observar alterações na concentração sérica de ureia e creatinina em quatro dos animais utilizados neste experimento. O intervalo de referência desses indicadores para a espécie é de 20,14 - 61,93 mg/dL e 0 - 0,87 mg/dL, para ureia e creatinina, respectivamente (MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1984; HEIN e HARMANN, 2003). Em três animais utilizados neste experimento (cobaias 8, 9 e 12), foi possível observar aumento dos níveis séricos de ureia, creatinina (além de fósforo e SDMA, que serão discutidos adiante), 24 horas após injeção do veneno. O animal 11 (47,985 µL) também apresentou aumento do nível de ureia no sangue. Mas, infelizmente, por falta de amostra não foi possível dosar os outros analitos (creatinina, fósforo e SDMA), não sendo possível afirmar se o mesmo apresentou quadro de IRA, já que outros fatores, como disfunções hepáticas, dieta, desidratação, insuficiência cardíaca congestiva também podem elevar a concentração de ureia sérica (STEVENS e LEVEV, 2005; LEVIDIGAL, 2009).

O modelo conceitual de IRA identifica quatro componentes: risco (rim normal e risco aumentado); fase intermédia (lesão funcional); IRA (com diminuição da filtração glomerular e insuficiência renal), e desfechos (insuficiência renal e morte). Pela definição de IRA, baseada na creatinina sérica, o diagnóstico da lesão renal ocorre somente na fase da diminuição da filtração glomerular e aumento da creatinina sérica.

Considerando que a lesão renal tem início mais precoce, as intervenções baseadas no diagnóstico pela creatinina sérica serão sempre tardias. A utilização de biomarcadores precoces de injúria renal poderia ajudar a identificação da lesão antes do decréscimo na TFG detectado pela creatinina. O início de intervenções mais precoces poderia alterar o curso da IRA e evitar ou atenuar os desfechos desfavoráveis associados a essa síndrome (HASSE *et al.*, 2009). Portanto, a dosagem da SDMA, ou outros biomarcadores, se faz necessária.

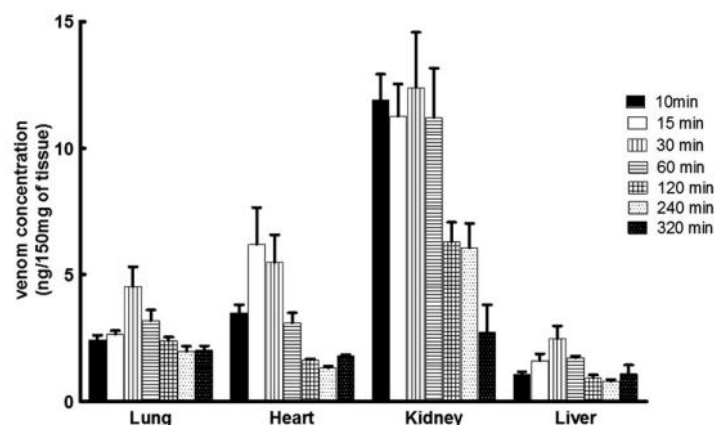
Três animais (8, 9 e 12) apresentaram valores de SDMA acima do limite permitido 24 horas após a injeção do veneno, sendo que o maior valor (36 µg/dL) foi observado no animal 12 (76,775 µL). Infelizmente, esses animais foram a óbito ficando uma lacuna dos resultados de SDMA no tempo 72h. Mas, dos envenenados sobreviventes, os animais 1 e 4 também mostraram aumento sérico de SDMA (17 e 15 µg/dL), respectivamente.

SDMA é um biomarcador renal de alta precisão para estimar a TGF, sendo mais sensível do que creatinina sérica para avaliar a disfunção renal (RELFORD *et al.*, 2016), permitindo um diagnóstico precoce e, já faz parte das diretrizes estabelecidas pela IRIS (*International Renal Interest Society*) para estadiamento da DRC precoce e avançada (HALL *et al.*, 2017). Segundo Bilbrought *et al.* (2018), o SDMA aumenta quando há, em média, uma redução entre 40% e 25% na taxa de filtração glomerular, sendo esse aumento relacionado com uma lesão renal aguda ou ativa e lesão crônica de doença renal. Atualmente, não existem valores de referência para SDMA em cobaias, porém, a partir dos resultados encontrados nos animais usados como controles e em cães, estimou-se que os valores normais de SDMA na cobaia teriam um limite máximo de 14 µg/dL.

Os valores séricos de fósforo também foram dosados. A diminuição da TGF é a causa mais comum de hiperfosfatemia em animais, sendo, portanto, comum às insuficiências renais agudas e crônicas. Em alguns animais o aumento de fósforo é proporcional o aumento de nitrogênio ureico (THRALL *et al.*, 2017). De acordo com o intervalo de referência para a espécie (3,2 a 21,6 mg/dL) (MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1984; HEIN e HARMANN, 2003), novamente, apenas os animais 9 (28,477 µL) e 12 (76,775 µL) apresentaram hiperfosfatemia.

4.3.2. Biomarcadores cardiovasculares

Os efeitos cardiotoxicos causados pelo veneno de *Loxosceles intermedia* podem ter um papel importante no quadro clínico do loxoscelismo sistêmico. A esfingomielinase D é a toxina apontada como principal responsável pelo desenvolvimento de disfunções cardíacas observadas em ratos. Em estudos realizados para identificar a biodistribuição de veneno em rins, coração, pulmões e fígado de ratos, utilizando o método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA), a segunda maior concentração de veneno foi relatada no coração (DIAS-LOPES *et al.*, 2010). A figura 14 mostra a distribuição ao longo do tempo em ratos inoculados com 2,5 µg de veneno de *L. intermedia*.



Biodistribution of *L. intermedia* whole venom antigens in kidney, heart, lung and liver, as determined by ELISA, in mice following a single s.c. injection of 2.5 µg of venom.

Figura 14: Biodistribuição de veneno de *L. intermedia* em pulmões, coração, rins e fígado, determinado por ELISA, em ratos após a injeção de dose única de 2,5 µg de veneno. Fonte: Dias-Lopes *et al.*, (2010).

Além disso, também foi observada ligação direta do veneno no coração e no fígado, associada ao aumento de creatinoquinase (CK) e da fração cardíaca (CK-MB), a partir de quatro horas após a inoculação de veneno (DIAS-LOPES *et al.*, 2010). Os valores referentes à concentração sérica de CK e CK-MB, dosados 24 e 72 horas após o envenenamento loxoscélico estão apresentados na Tabela 4. Os valores de referência para a espécie estão descritos na Tabela 5.

Tabela 4: Concentrações séricas de CK e sua fração CK-MB de cobaias, 24 horas (T24) e 72 horas (T72) após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*

Animal (Dose)	CK (U/L) (T24)	CK-MB (U/L) (T24)	CK (U/L) (T72)	CK-MB (U/L) (T72)
Cobaia 1 (11,627 µg)	2.117,78	196,81	2174,77	165,32
Cobaia 2 (12,789 µg)	5.772,19	358,63	308,68	115,68
Cobaia 3 (14,068 µg)	145,60	-	761,1	116,2
Cobaia 4 (15,475 µg)	4.100,88	294,4	928,3	165,5
Cobaia 5 (17,795 µg)	-	-	11.389,7	546,6
Cobaia 6 (18,725 µg)	3.695,41	280,71	240,3	56,86
Cobaia 7 (21,533 µg)	760,49	208,12	-	-
Cobaia 8 (24,762 µg)	3.695,30	335,1	-	-
Cobaia 9 (28,477 µg)	1.141,28	303,32	-	-
Cobaia 10 (29,995 µg)	397,40	194,49	-	-
Cobaia 11 (47,985 µg)	-	-	-	-
Cobaia 12 (76,775 µg)	7.1842,4	2.014,17	-	-
Controle A	1.322,94	314,5	1.901,0	163,56
Controle B	1.488,32	279,86	3.217,72	307,27

Tabela 5: Intervalo de referência para concentração sérica de CK e CK-MB em cobaias (*Cavia porcellus*).

Analito	Intervalo de Referência
CK	0 – 2.143 U/L *
CK-MB	29 – 422,68 U/L **

* Fonte: MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1994; HEIN e HARMANN, 2003.

** Fonte: BOTELHO *et al.*, 2016.

Existem vários biomarcadores cardíacos disponíveis, alguns de lesão cardíaca ou necrose e outros de função cardíaca. Os principais biomarcadores de lesão cardíaca são: creatinoquinase isoenzima MB e as troponinas I, T e C; e o biomarcador de função cardíaca é o peptídeo natriurético tipo B (Pró-BNP).

A CK e sua isoenzima CK-MB dosadas no soro sanguíneo, são marcadores bem estabelecidos e creditados para o diagnóstico e acompanhamento de lesões cardíaca ou infarto do miocárdio (BACHMAIER *et al.*, 1995). A CK é uma enzima presente em altas concentrações nas musculaturas esquelética, cardíaca e lisa, assim como no cérebro, sendo que quantidades menores estão presentes em vários outros órgãos, tais como intestinos, fígado e baço. Ela é encontrada livre no citoplasma de células musculares e extravasam quando essas células são lesadas. Dessa forma, a CK é uma enzima considerada músculo-específica (KELLER 1981; BOYD, 1983; THRALL *et al.*, 2017).

Cinco animais apresentaram níveis de CK acima do limite máximo de normalidade: 2 (12,789 µg), 4 (15,475 µg), 6 (18,725 µg), 8 (24,765 µg) e 12 (47,985 µg), no tempo 24h após injeção do veneno (Tabela 4). Esse aumento pode ser decorrente da ação miotóxica do veneno *L. intermedia*, agindo diretamente nas fibras musculares. Estudos avaliando a cinética do CK descrevem que o pico sérico se dá entre 6 a 12 horas após o agravo no músculo (Allison, 2012). Um animal usado como controle (Controle B) também apresentou valor de CK total no tempo T72h, acima do limite máximo utilizado como referência (Tabela 4). Porém, por se tratar também de um marcador de lesão muscular, esses aumentos podem estar associados ao processo de coleta de sangue, e não somente ao envenenamento *per se*, justificando essa elevação.

Comparando com os resultados de Botelho *et al.* (2016), a fração cardíaca CK-MB, mostrou-se aumentada em alguns animais: 5 (17,795 µg), após 72 horas e 12 (47,985 µg), após 24 horas. A dosagem da CK-MB vem sendo utilizada como principal método para confirmação ou exclusão do infarto agudo do miocárdio e picos de CK-MB podem prever eventos cardíacos desfavoráveis em humanos. No entanto, CK e CK-MB não são marcadores tão eficazes de danos no miocárdio em animais, sendo a CK-MB um marcador cardíaco menos específico que a troponina cardíaca, uma vez que pode ser encontrada principalmente nos intestinos, nos pulmões, no baço e apenas pequena quantidade no miocárdio (THRALL *et al.*, 2017).

Dessa forma, as dosagens de CK e CK-MB devem vir acompanhadas por outros biomarcadores cardíacos. Em medicina veterinária, por exemplo, a dosagem sérica de troponina tem sido utilizada atualmente para avaliação de cardiotoxicidade de fármacos em protocolos quimioterápicos e de peçonhas em envenenamentos experimentais (CAMPLESI *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2014).

As troponinas (Tn) constituem três isoformas tecidos específicos denominados de troponina I (TnI), troponina T (TnT) e troponina C (TnC). A troponina I (subunidade inibidora da actina), troponina T (subunidade ligada à miosina – tropomiosina) e a troponina C (subunidade ligada ao cálcio e reguladora da contração). A troponina C é encontrada em tecidos de contração lenta, portanto não está presente na musculatura cardíaca, e não é relevante para o diagnóstico precoce de lesão cardíaca (Adams *et al.*, 1993). A Troponina cardíaca I é um dos componentes do complexo de troponinas cardíacas que responsável pela contração muscular e é considerada o biomarcador padrão ouro para o diagnóstico de lesão cardíaca (THYGESEN, 2007). Após a ocorrência de lesões cardíacas, é possível observar seu aumento nos níveis séricos do sangue cerca de 12 a 24 horas (ENGLE *et al.*, 2009). Em vista disso, também foram realizados testes para dosagem de Troponina I nos animais deste experimento, e os valores encontrados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Concentrações séricas de Troponina I de cobaias, 24 horas (T24) e 72 horas (T72) após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*

Animal (Dose)	Troponina I (ng/mL) (T24)	Troponina I (ng/mL) (T72)
Cobaia 1 (11,627 µg)	< 0,01	0,25
Cobaia 2 (12,789 µg)	< 0,01	12,3
Cobaia 3 (14,068 µg)	< 0,01	< 0,01
Cobaia 4 (15,475 µg)	< 0,01	0,03
Cobaia 5 (17,795 µg)	0,29	-
Cobaia 6 (18,725 µg)	< 0,01	> 20,0
Cobaia 7 (21,533 µg)	-	-
Cobaia 8 (24,762 µg)	10,0	-
Cobaia 9 (28,477 µg)	12,2	-
Cobaia 10 (29,995 µg)	4,4	-
Cobaia 11 (47,985 µg)	-	-
Cobaia 12 (76,775 µg)	12,7	-
Controle A	< 0,01	< 0,01
Controle B	< 0,01	< 0,01

Em relação aos demais mamíferos, as cobaias apresentam, normalmente, valores maiores de troponina I (Life Diagnostics, 2022). Os valores de referência para a espécie estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Intervalo de referência para concentração sérica de Troponina I em cobaias (*Cavia porcellus*)

Analito	Intervalo de Referência*
Troponina I	0,2 – 12,5 ng/mL

Fonte: Life Diagnostics, 2022.

Apenas dois animais apresentaram aumentos de Troponina I em relação aos valores de referência, ambos após aplicação do veneno de *L. intermedia*: os animais 6 (18,725 µg), após 72 horas e 12 (76,775 µg), após 24 horas. Os animais 6 (18,725 µg), 8 (24,762 µg), 9 (28,477 µg) e 12 (76,775 µg) mostraram níveis mais altos de Troponina I e também de CK total, sugerindo um possível efeito cardiotoxico do veneno de *Loxosceles intermedia*. Já o animal 5, mostrou um alto valor sérico da CK total (11.389,7 U/L) e de sua fração MB (546,6 U/L) 72h após o envenenamento, mas sem aumento significativo da Troponina I.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima intracelular envolvida na glicólise anaeróbica através da oxidação do piruvato em lactato. A dosagem sérica de LDH é realizada rotineiramente para diversas doenças. Níveis altos de LDH são associados à prognósticos ruins, especialmente em tumores e processos inflamatórios (GALLO *et al.*, 2015; PETRELLI *et al.*, 2015; PETRELLI *et al.*, 2019). Diversas lesões nos tecidos causam o extravasamento de LDH para o sangue, sendo considerada uma enzima altamente inespecífica. A enzima LDH é encontrada nos eritrócitos, hepatócitos, músculo e cardiomiócitos, dessa forma, LDH é um biomarcador sistêmico do organismo por possuir ampla distribuição no mesmo. Por este motivo, a avaliação de LDH deve ser realizada concomitantemente com os outros resultados bioquímicos (THRALL *et al.*, 2012).

Os níveis séricos de LDH observados nos animais testados estão descritos na Tabela 7, e os valores de referência estão na tabela 8. Observou-se alterações nos níveis séricos de LDH nos animais 5 (17,795 µg), 11 (47,985 µg) e 12 (76,755 µg), 24

horas após o envenenamento experimental e após 72 horas no animal 5 (17,795 µg); Estes resultados, em associação aos valores de CK total e CK-MB, bem como aos de Troponina I, elucidados anteriormente, corroboram a evidência dos efeitos cardiotoxicos causados pelo veneno de *L. intermedia*.

Tabela 8: Concentrações séricas de LDH(U/L) de cobaias, 24 horas (T24) e 72 horas (T72), após injeção intradérmica de veneno de *Loxosceles intermedia*.

Animal (Dose)	LDH (U/L) (T24)	LDH (U/L) (T72)
Cobaia 1 (11,627 µg)	431	245
Cobaia 2 (12,789 µg)	315,3	208,3
Cobaia 3 (14,068 µg)	256,2	115,8
Cobaia 4 (15,475 µg)	181,1	116,1
Cobaia 5 (17,795 µg)	531,9	914,0
Cobaia 6 (18,725 µg)	386,0	113,0
Cobaia 7 (21,533 µg)	374,3	-
Cobaia 8 (24,762 µg)	-	-
Cobaia 9 (28,477 µg)	-	-
Cobaia 10 (29,995 µg)	430,5	-
Cobaia 11 (47,985 µg)	1320,0	-
Cobaia 12 (76,775 µg)	1206,0	-
Controle A	429,0	439,0
Controle B	388,0	127,0

Tabela 9: Intervalo de referência para concentração sérica de Lactato Desidrogenase (LDH) em cobaias (*Cavia porcellus*)

Analito	Intervalo de Referência*
LDH	0-515 U/L

*Fonte: MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1984; HEIN e HARMANN, 2003.

Também foram realizados testes para dosagem de NT-proBNP, que são moléculas que possuem um papel central na homeostasia cardiovascular, endócrina e renal, pertencentes à classe dos peptídeos natriuréticos. Estão associados à sobrecarga ventricular esquerda e ao estresse da parede ventricular, sobretudo em quadros de insuficiência cardíaca, disfunção ventricular esquerda e em situações de disfunção ventricular direita, quando são liberados no sangue (PRUSZCZYK, 2005; KACZYNSKA *et al.*, 2006). Todos os valores encontrados para NT-proBNP ficaram abaixo do limite inferior de quantificação do teste (< 500 pmol/L).

A dosagem do D-dímero é considerada útil no diagnóstico e monitoramento de uma vasta gama de condições clínicas relacionadas à ocorrência de trombos, como CID, tromboembolismo venoso, cardiopatia isquêmica, acidente vascular cerebral e terapia trombolítica (TRIPODI, 2011). Além dos distúrbios hematológicos que podem ocorrer em alguns casos de toxoscélismo sistêmico, alterações hemostáticas e de coagulação também são descritas. As coagulopatias e a trombocitopenia são manifestações consideradas raras e não há um critério pré-definido para a o diagnóstico da CID nesses pacientes (GREMSKI *et al*, 2014; DE MORAES *et al.*, 2014; IBSTER E FAN, 2011; VETTER E SWANSON, 2011; DA SILVA *et al.*, 2004; MALAQUE *et al*, 2011, ROSEN *et al*, 2012)

O D-dímero é um produto específico da degradação de coágulos de fibrina, que ocorrem pela ação de três enzimas: (a) trombina, gerada a partir da ativação da cascata de coagulação que converte o fibrinogênio em coágulos de fibrina; (b) fator XIII ativado que liga os coágulos de fibrina por meio de ligações covalentes entre monômeros de fibrina; e (c) plasmina, a última enzima da fibrinólise que degrada a fibrina reticulada (GAFFNEY, 2001; MEDVED e NIEUWENHUIZEN, 2003). É um índice confiável e sensível. Valores elevados indicam a presença de níveis anormais de produtos da degradação de fibrina no organismo (ECODiagnóstico). Os valores de

concentração sérica do D-dímero encontrados nas cobaias desde experimento ficaram abaixo do limite mínimo de quantificação ($<0,1 \mu\text{g/mL}$) nos tempos avaliados.

Em um estudo retrospectivo em pacientes humanos admitidos no Hospital Vital Brazil, devido à acidentes com aranha marrom, entre os anos de 2004-2006, 53,5% dos pacientes apresentavam níveis elevados de D-dímero após uma semana, e 25% após duas semanas, porém, nenhum deles foi diagnosticado com CID (MALAQUE *et al*, 2011). Essas alterações se relacionam principalmente à dermonecrose, devido à presença de vasculite e trombose (TAVARES *et al.*, 2004; MCGLASSON *et al*, 2007). Nessas alterações, observa-se ativação da cascata de coagulação e agregação plaquetária, o que explica as alterações no perfil, principalmente no número de plaquetas. Clinicamente, a anormalidade da coagulação e o achado relacionado, como o D-dímero, podem ser observados tanto nos casos complicados quanto em casos não complicados, o que possivelmente o descartaria como um índice preditor de gravidade (PICHARDO-RODRIGUEZ e GRANDEZ-URBINA, 2016). Em medicina veterinária, os dados relativos à dosagem de D-dímero em animais são escassos. Porém, neste experimento, não foram observadas alterações em nenhum dos animais.

4.3.3. Proteína total e frações

Quanto à avaliação do proteinograma (dosagem sérica da concentração de proteína total, albumina e globulinas) dos animais testados neste experimento, foi possível notar alterações em grande parte das cobaias (Tabela 10).

As proteínas plasmáticas assumem papéis de grande importância. São responsáveis pela formação da base das estruturas celulares, órgãos e tecidos, mantêm a pressão coloido-osmótica, catalisam reações bioquímicas na forma de enzimas, mantêm o equilíbrio ácido-base, são reguladoras como hormônios, atuam na coagulação sanguínea, na defesa humoral como anticorpos, são nutritivas e servem de carreadores e transporte para muitos constituintes plasmáticos (LOPES *et al.*, 2007).

Tabela 10: Concentrações séricas de Proteína Total, Albumina e Globulinas de cobaias, 24 horas (T24) e 72 horas (T72), após injeção intradérmica de veneno de *L. intermedia*

Animal (Dose)	Proteína Total (g/dL) (T24)	Albumina (g/dL) (T24)	Globulinas (g/dL) (T24)	Proteína Total (g/dL) (T72)	Albumina (g/dL) (T72)	Globulinas (g/dL) (T72)
Cobaia 1 (11,627 µg)	8,9	2,1	6,8	9,2	1,8	7,4
Cobaia 2 (12,789 µg)	9,3	1,9	7,4	6,7	1,0	5,7
Cobaia 3 (14,068 µg)	9,0	2,0	7	7,3	1,3	6,0
Cobaia 4 (15,475 µg)	9,4	1,7	7,7	6,9	0,9	6,0
Cobaia 5 (17,795 µg)	6,5	1,2	5,3	6,5	1,2	5,3
Cobaia 6 (18,725 µg)	5,0	0,9	4,1	5,0	2,5	2,5
Cobaia 7 (21,533 µg)	7,7	1,3	-	-	-	-
Cobaia 8 (24,762 µg)	8,7	1,8	-	-	-	-
Cobaia 9 (28,477 µg)	4,4	2,6	-	-	-	-
Cobaia 10 (29,995 µg)	7,4	1,5	-	-	-	-
Cobaia 11 (47,985 µg)	-	-	-	-	-	-
Cobaia 12 (76,775 µg)	4,4	1,3	-	-	-	-
Controle A	5,5	2,5	3,0	4,5	2,2	2,9
Controle B	9,4	2,2	7,2	6,5	3,9	2,6

Nos animais 1 (11,627 µg), 2 (12,789 µg), 3 (14,068 µg), 4 (15,475 µg), 7 (21,533 µg), 8 (24,762 µg) e 10 (29,995 µg), verificou-se a ocorrência de hiperproteinemia, associada à hipoalbuminemia a hiperglobulinemia 24 horas após a injeção intradérmica de veneno, que se manteve após 72 horas.

Os animais 5 (17,795 µg), 6 (18,725 µg), 9 (28,477 µg) e o 12 (76,775 µg), mostraram valores normais de proteína total, mas, os níveis de albumina encontrados estavam abaixo do intervalo de referência da espécie (Tabela 11). No tempo 72h, também pode-se observar as mesmas alterações, exceto pelos animais 6 (18,725 µg), e controle B.

Segundo Tavares *et al.* (2004), após injeção de *L. gaucho* em coelhos, não foram observadas alterações de concentração de proteína total nos animais, porém, após 72 horas foi relatada hipoalbuminemia.

Tabela 11: Intervalo de referência para concentração sérica de Proteína Total, Albumina e Globulinas em cobaias (*Cavia porcellus*)

Analito	Intervalo de Referência*
Proteína Total	4,4 a 6,6 g/dL
Albumina	2,6 a 4,1 g/dL
Globulina	1,7 a 2,6 g/dL

* Fonte: MANNING, WAGNER e HARKNESS, 1984; HEIN e HARMANN, 2003.

A albumina é a mais abundante das proteínas plasmáticas. Nos animais faz parte de 35 a 50% do total de proteínas séricas. As hipoalbuminemas podem ocorrer em várias situações advindas de dano hepático crônico, deficiência alimentar de fontes proteicas, parasitismos, doença renal (síndrome nefrótica, glomerulonefrite crônica, diabetes), síndrome da má absorção intestinal, hemorragias, enteropatia com perda de proteína e queimaduras graves. Ainda, tal situação decorre do catabolismo aumentado da albumina como consequência de deficiência energética, que estimula a mobilização de reservas de aminoácidos para entrarem na via da gliconeogênese (THRALL *et al.*, 2007). É classificada como uma proteína de fase aguda negativa, por

isso, em inflamações agudas, sua síntese e conseqüentemente, sua concentração sérica diminuem em eventos pro-inflamatórios. Já a concentração de globulinas tipicamente se encontra elevada em razão da maior síntese de proteínas de fase aguda, o que ocorre normalmente em processos inflamatórios agudos (THRALL *et al.*, 2017).

Dessa forma, a melhor maneira de se avaliar as alterações das proteínas séricas é através da interpretação da relação albumina: globulinas (A:G). No quadro 3 estão representadas as relações A:G e prováveis causas e patologias.

Quadro 3: Relações A:G e prováveis causas e patologias (adaptado de Lopes, 2007)

Relação A:G	Causas prováveis	Possíveis Patologias
Alterada	Hipoalbuminemia	Perda seletiva de albumina (doença renal e gastrointestinal), decréscimo de síntese de albumina (hepatopatia, má nutrição).
	Hiperglobulinemia	<p>α-globulina: Doença inflamatória aguda, severa hepatite ativa, nefrite aguda ou síndrome nefrótica;</p> <p>β-globulina: Hepatite aguda, síndrome nefrótica, dermatopatias supurativas;</p> <p>γ-globulina: Doença inflamatória crônica, doença infecciosa, hepatite crônica, abscesso hepático, doença supurativa, doença imuno-mediada, tumores (linfossarcoma, mieloma múltiplo).</p>
Normal	Hiperproteinemia	Desidratação (vômito, diarreia, queimaduras)
	Hipoproteinemia	Super hidratação, perda aguda de sangue, perda externa de plasma (doenças exsudativas, diarreia), perda interna de plasma (doença gastrointestinal, parasitas)

Também é importante salientar que, em quadros de doença glomerular também pode ser observada a ocorrência de hipoalbuminemia seletiva. Isso se deve à

passagem das moléculas de albumina – que são menores e com maior carga negativa - pelas membranas glomerulares lesionadas. O mesmo não ocorre com as globulinas. Dessa forma, os valores sérios das proteínas plasmáticas devem ser associados à concentração de proteína na urina, bem como à razão proteína:creatinina urinária. Estas devem estar aumentadas para que seja feito o diagnóstico de animais com hipoalbuminemia causada por doença glomerular (CENTER et al. 1987, GRAUER, 2005).

Em vista desses fatores, é possível presumir que as alterações encontradas no proteinograma das cobaias citadas anteriormente possam ser justificadas devido ao quadro inflamatório agudo, desidratação e em alguns casos, possivelmente, à doença renal causada pelo envenenamento.

4.4. Urinálise

O exame de urina é uma ferramenta diagnóstica de grande valor, uma vez que, através dele, é possível distinguir uma vasta gama de doenças que poderiam passar despercebidas por não causarem sinais ou sintomas marcantes. Exemplos dessas patologias incluem glomerulonefrites e infecções urinárias crônicas. Pela análise de características da urina como a coloração, turbidez, microscopia, análise de sedimentos urinários e dosagens bioquímicas, juntamente à cultura microbiana e testes de sensibilidades, é possível identificar a maioria dos distúrbios do trato urinário em animais domésticos (PARRAH *et al.*, 2013).

Os efeitos nefrotóxicos do veneno loxoscélico são demonstrados com base nas alterações laboratoriais dos pacientes acometidos e geralmente incluem aumento de ureia e creatinina, alcalinização da urina, proteinúria, hematúria e hemoglobinúria (CHAIM *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2014).

Segundo os valores de referência estabelecidos por Chernochova *et al.* (2020), foi possível identificar algumas alterações na urina das cobaias após o envenenamento loxoscélico experimental. Ao exame físico, todos, incluindo os controles, apresentaram urina de coloração brancacenta à palha escura, variando para tonalidades amarronzadas. Além disso, todos possuíam alta turbidez urinária. Ambas essas características são particularidades encontradas normalmente na urina de cobaias. A turbidez se deve a presença de cálcio e partículas amorfas, já a pigmentúria pode ocorrer em roedores, a depender da dieta (ESHAR, 2015).

A densidade específica urinária (DEU) é um índice diretamente proporcional à osmolalidade, sendo um parâmetro utilizado para avaliar a habilidade dos rins de concentrar ou diluir a urina a partir do plasma (PARRAH *et al.*, 2013). Em 75% dos animais, foi observado aumento de DEU. Segundo Thrall *et al.* (2017), espera-se aumento da densidade urinária em razão da desidratação.

Ao exame químico, realizado através do uso de fitas reagentes semiquantitativas, nota-se uma diminuição do pH da urina em alguns dos animais. Em cobaias saudáveis, a variação do pH varia entre 8 - 9 (WESCHE, 2009). A diminuição do pH urinário ocorre em eventos patológicos que resultam em aumento do catabolismo tissular, como: estados febris, jejum, acidose metabólica e respiratória, na diabetes e nas glomerulonefrites. Essa alteração foi observada nos animais 7 (21,533 µg), 11 (47,985) µg e 12 (76,775 µg), 24 horas após o envenenamento.

As cobaias 7 (21,533 µg), 9 (28,477 µg), 12 (76,775 µg), 13 (105 µg), 14 (140 µg), 15 (210 µg) e 16 (350 µg) apresentaram glicosúria em alguns momentos. Este achado pode estar relacionado ao estresse, mas a glicosúria, quando não associada à hiperglicemia, pode ocorrer quando há diminuição da capacidade de reabsorção renal da glicose, o que é resultado de anormalidades tubulares proximais, que incluem aquelas causadas por isquemia, nefrotoxinas e amiloidose (DIBARTOLA *et al.*, 1989; WESCHE, 2009; JENKIS, 2010).

A presença de corpos cetônicos na urina também foi relevante em todos os animais, com exceção das cobaias 1 (11,627 µg), 6 (18,725 µg), 8 (24,762 µg) e 9 (28,477 µg). Segundo Parrah *et al.* (2013), a cetonúria pode ocorrer na diabetes melito e também em casos de inanição e anorexia. Porém, segundo Thrall *et al.* (2017), em coelhos e roedores, na insuficiência renal, causada por nefrites, a cetonúria se apresenta como um dos sinais, juntamente à isostenúria, proteinúria, piúria e presença de cilindros na urina.

Além disso, foram vistas reações positivas nas fitas reagentes semiquantitativas para sangue oculto na amostra de urina dos animais 4 (15, 475 µg), 5 (17,795 µg), 6 (18,725 µg), 11 (47,985 µg), 12 (76,775 µg), 13 (105 µg), 14 (140 µg), 15 (210 µg), 16 (350 µg) e, em ambos os animais controle. É importante ressaltar que a hemoglobinúria e mioglobinúria também podem causar positividade nesta reação, que se dá através da detecção da presença de ferro na amostra. Além disso, a presença de bactérias e a contaminação por produtos de limpeza – que foram utilizados para limpar as bandejas metálicas utilizadas nas coletas – também podem gerar falsos-positivos. Por isso, esses resultados devem ser correlacionados à sedimentoscopia para verificação da presença de eritrócitos, à DEU, ao pH urinário e ao VG (THRALL *et al.*, 2017). Dessa forma, esse achado só se torna relevante nas cobaias 5 (17,795 µg) e 12 (76,775 µg), que apresentaram reações positivas acima de 3 +, após 24 horas. Apesar de não observada hematúria relevante na análise microscópica (acima de cinco hemácias por campo de grande aumento), a concentração de heme nestes animais foi muito maior do que a encontrada nos demais. Dessa forma, é admissível supor que ambos apresentaram quadro de mioglobinúria e/ou hemoglobinúria, que são provocadas, respectivamente, pela ocorrência de extensas lesões musculares e hemólise intravascular, principalmente. Este achado, juntamente ao aumento de CHCM observado no animal 12 (76,775 µg), contribui com a hipótese da ocorrência de anemia hemolítica após o envenenamento por *L. intermedia*. Infelizmente, os

animais 13, 14, 15 e 16 que receberam doses elevadas no veneno (entre 105 e 350 µg), foram a óbito e não foi possível a avaliação do CHCM, que confirmaria a hemólise. Mas, pode-se sugerir que picadas com injeção de maiores doses de veneno de *L. intermedia* seriam responsáveis pela presença de hemoglobinúria.

Por fim, ao exame químico, uma relevante anomalia observada foi a presença de grandes concentrações de proteína na urina. Segundo Wesche (2009), a indicação da presença de proteínas na urina através de fitas reagentes em cobaias e demais herbívoros não é confiável, uma vez que podem ocorrer falsos-positivos devido à alcalinidade da urina. Além disso, em estudos realizados por Cernochova *et al.* (2020), para determinação de perfil bioquímico urinário de cobaias, foi observada a ocorrência de proteinúria normalmente em animais saudáveis. Porém, neste experimento, foi observado um aumento exponencial da concentração de proteínas na urina ao longo do tempo em todos os animais após exposição ao veneno de *L. intermedia*. Enquanto isso, os níveis encontrados nos animais-controle mantiveram-se baixos durante as avaliações.

Dessa forma, apesar das limitações citadas, é possível apontar um aumento progressivo da proteinúria nestes animais. A figura 15 mostra a média da concentração de proteínas da urina encontrada através da fita reagente nos animais inoculados com veneno de *L. intermedia*, juntamente à sua linha de tendência (pontilhada), e a média da concentração de proteínas nos animais desafiados somente com solução fisiológica 0,9%, ao longo dos tempos T1, T24, T48 e T72. O contraste observado entre os dois tratamentos demonstra o agravamento na proteinúria nas cobaias após o envenenamento.

A proteinúria se dá pela perda da capacidade de retenção de proteínas de cargas negativas, como a albumina, pelos glomérulos. Isso acontece na patogenia das glomerulonefrites, que, através da deposição de imunoglobulinas nas membranas basais dos glomérulos, que são proteínas de carga positiva, fazem com que essas estruturas se polarizem positivamente, causando essa perda de função e liberando essas substâncias na urina, o que faz com que a presença de proteínas na urina seja indicadora de lesão glomerular, precedendo à ocorrência de azotemia (THRALL *et al.*, 2017).

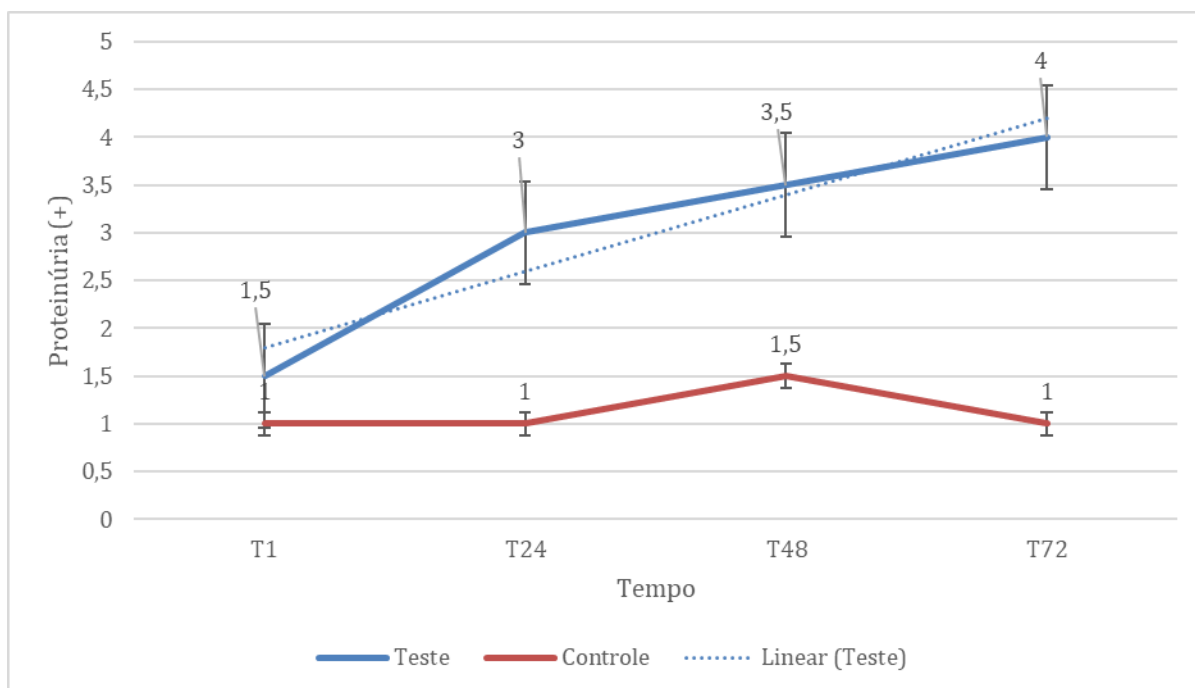


Figura 15: Concentração de proteínas da urina (+) nos animais inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia* (em azul), juntamente à sua linha de tendência (pontilhada), e a concentração de proteínas (+) nos animais tratados com solução fisiológica 0,9% (em vermelho), ao longo dos tempos 1h, 24h, 48h e 72h.

A forma mais precisa para a avaliação da proteinúria é a determinação da relação proteína:creatinina urinária (RP/C), uma vez que não há interferência em relação à DEU (Parrah *et al.*, 2011). Para definir esta razão, foram realizados os exames bioquímicos para dosagem da concentração de proteína na urina (mg/dL) e de creatinina urinária (mg/dL). Os resultados da RP/C encontrados estão apresentados na figura 16. Por meio dessa análise, pode-se conferir importante proteinúria, principalmente nos animais 2 (12,789 µg), 3 (14,068 µg), 4 (15,475 µg), 5 (17,795 µg), 6 (18,725 µg), 13 (47,985 µg), 14 (140 µg) e 15 (210 µg).

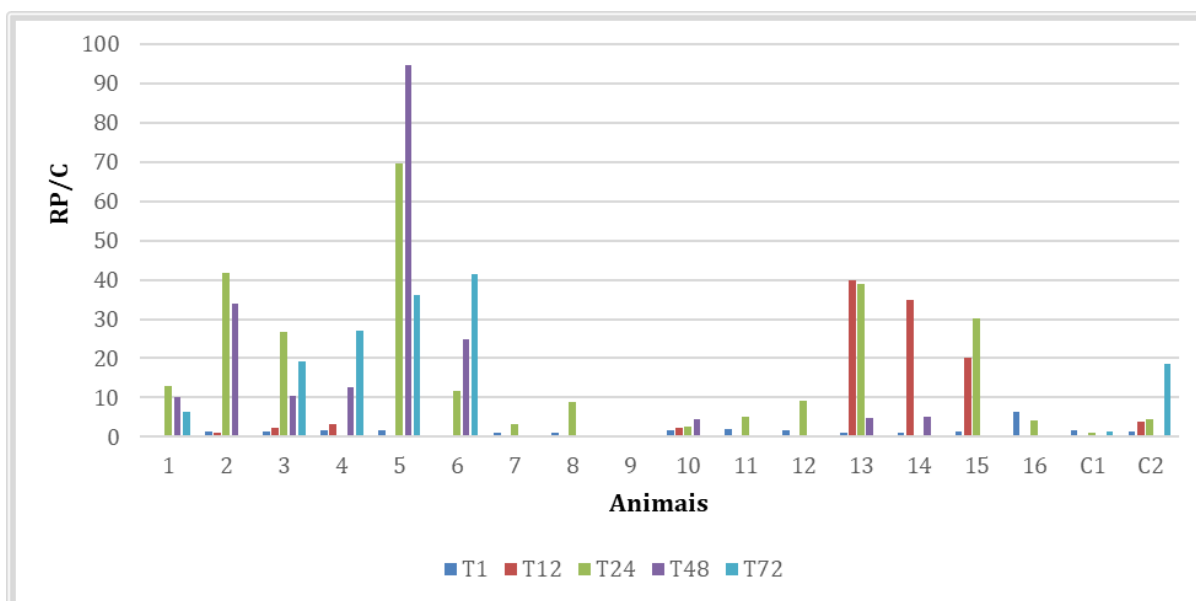


Figura 16: Relação proteína: creatinina urinária (RP/C) da urina nos animais inoculados com veneno de *L. intermedia* e com solução fisiológica 0,9% (controle), ao longo dos tempos 1 hora (T1), 12 horas (T12), 48 horas (T48) e 72 horas (T72).

A dosagem bioquímica de enzimas urinárias, como a gama-glutamil transferase (GGT) é uma alternativa útil para determinação de lesões tubulares agudas precoces em relação à azotemia. Esta enzima, em condições normais, está aderida à membrana basal e não é filtrada pelos glomérulos. Diante disso, a presença dessa substância na urina reflete a ocorrência de danos ao epitélio tubular (THRALL *et al.*, 2017). Porém, de acordo com Cernochova *et al.* (2020), em cobaias, concentrações discretas de GGT urinária podem ser consideradas normais na espécie. Em relação às dosagens urinárias de GGT observadas nos animais controle, supõe-se aumento da concentração desta enzima em todos os animais, com exceção da cobaia 3 (14,068 µg), como pode ser observado na figura 15.

Mancinelli *et al.* (2012), trabalhando com urina fresca de coelhos relataram que valores entre 0,043-1,034 UI/L, são normalmente encontrados. A figura 15 mostra que 100% dos animais que receberam veneno de *L. intermedia* (exceto pelo animal 9, que não foi dosada a GGT urinária) mostraram valores de GGT urinária acima de 7,0 UI/L, valor máximo encontrado nos animais controle (C1 e C2), em algum momento estudado. Salienta-se que, os animais 5, 7, 11, 12, 15 e 16, apresentaram os maiores valores (acima de 40 UI/L). Os animais 13 e 14, apesar de mostrarem valores abaixo

de 40 UI/L (31,1 UI/L e 39,5 UI/L, respectivamente), esses estão cerca de 4,44 e 5,64 vezes acima do maior valor observado no animal controle (7,0 UI/L).

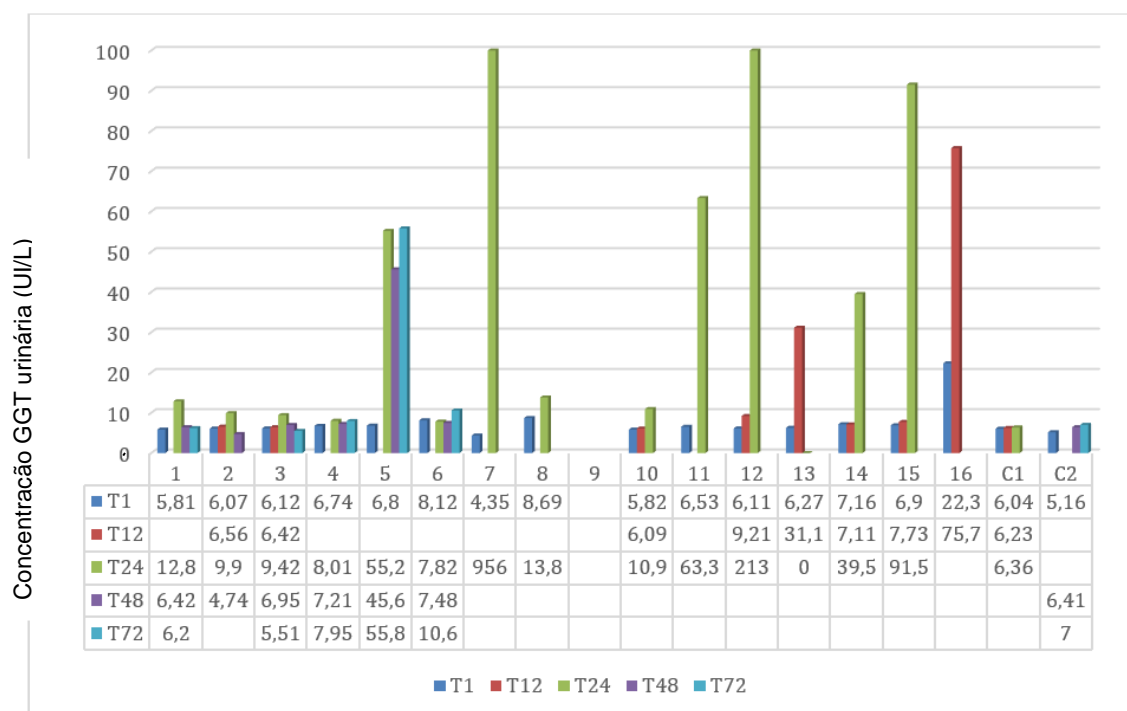


Figura 17: Concentração de GGT urinária (UI/L) nos animais inoculados com veneno de *L. intermedia* e com solução fisiológica 0,9% (controle), ao longo dos tempos 1h (T1), 12h (T12), 48h (T48) e 72h (T72).

Mas, ao se estabelecer a relação de GGT:creatinina urinária, com o objetivo de remover a interferência causada pela DEU das amostras de urina, obtêm-se resultados mais precisos, sendo observadas alterações – em comparação aos controles – nos animais 5 (17,795 μg), 6 (18,725 μg), 7 (21,533 μg), 11 (47,985 μg), 12 (76,775 μg), 13 (105 μg) e 14 (140 μg), como mostra a figura 17. Com isso, é possível presumir a ocorrência de lesões tubulares nestes animais, porém, para afirmar, são necessários exames complementares como o histopatológico que serão apresentados e discutidos adiante.

A proporção de gama-glutamil transferase (GGT) para creatinina na urina tem sido usada para monitorar pacientes com risco de lesão renal aguda. Ilchyshyn *et al.*

(2019), validaram a quantificação espectrofotométrica de GGT na urina de 41 cães saudáveis em um analisador bioquímico comercial mostrando que a relação GGT/creatinina na urina foi de 8,5-28,5 U/g. Os autores também observaram que a GGT na urina não foi afetada por hematúria, hemoglobinúria ou bacteriúria, permanecendo estável a 20°C e 4°C por até três dias, mas que, o pH fora da faixa de 6,5-8,0 resulta na redução da atividade da GGT.

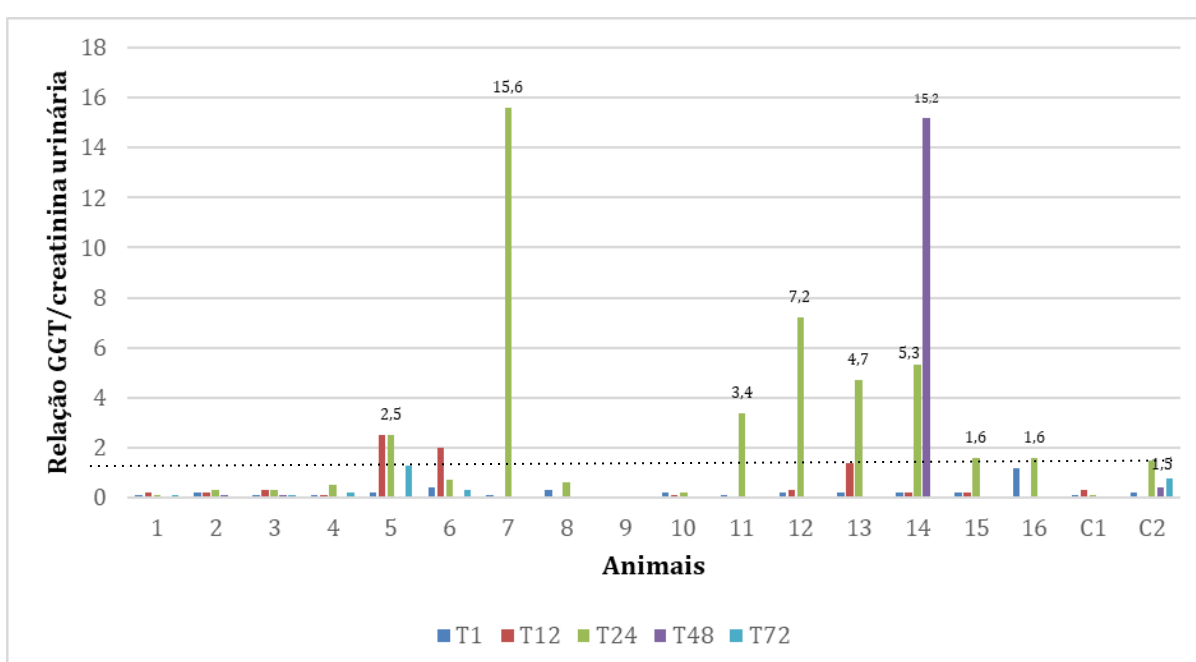


Figura 18: Relação GGT:creatinina urinária nos animais inoculados com veneno de *L. intermedia* e com solução fisiológica 0,9% (controle), ao longo dos tempos 1h (T1), 12h (T12), 48h (T48) e 72h (T72).

No exame de sedimentoscopia da urina, avaliado por microscopia óptica, pesquisou-se a presença de hemácias, leucócitos, bactérias, células epiteliais, cilindros e cristais. Em todos os animais, houve abundante flora bacteriana, o que se deve ao método de coleta utilizado. Ademais, na microscopia óptica foi identificada cristalúria em todos os animais. Em condições normais, a urina de cobaias saudáveis é rica em cristais, principalmente os de carbonato de cálcio (Quesenberry *et al*, 2012; Thrall *et al*, 2017). Porém, além de cristais de carbonato de cálcio, também foram

verificados cristais de oxalato de cálcio mono e di-hidratados, fosfato de cálcio e cristais de fosfato-amoníaco-magnésiano (FAM), como mostrado na Figura 19.

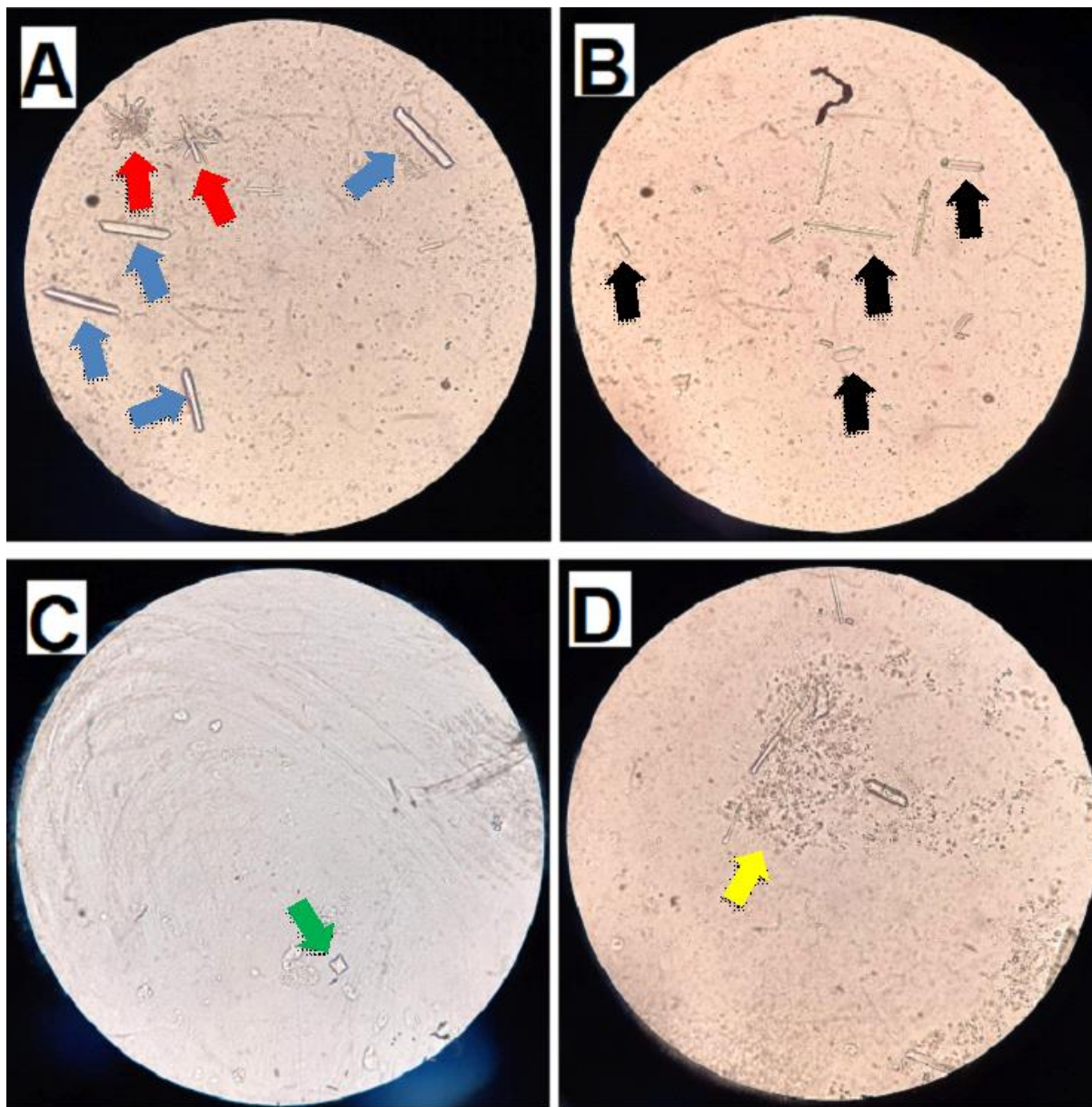


Figura 19: Cristais identificados na urina das cobaias. A: Cristais de fosfato de cálcio (seta azul) e cristais de carbonato de cálcio em forma de roseta (seta vermelha). B: Cristais de FAM (seta preta). C: Cristais de oxalato de cálcio di-hidratado (Seta verde). D: Oxalato de cálcio mono-hidratado (Seta amarela). Fonte: Arquivo Pessoal.

De forma geral, a presença de cristais na urina é considerada um achado incidental, sem importância clínica (THRALL *et al.*, 2017). Os cristais de carbonato de cálcio, fosfato de cálcio e FAM são normais na urina alcalina. Já os cristais de oxalato de cálcio (mono e di-hidratado), apesar de não serem comumente observados em urinas alcalinas, também podem ser considerados normais, visto que podem ser de ocorrência natural do organismo, estando relacionados à ingestão de alimentos ricos em oxalato (RIZZI *et al.*, 2017).

4.5. Eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) da urina e do veneno de *L. intermedia*

Por meio da análise do SDS-PAGE do veneno de *L. intermedia* utilizado neste experimento, foi possível notar a presença da demarcação de múltiplas bandas proteicas (Figura 20).

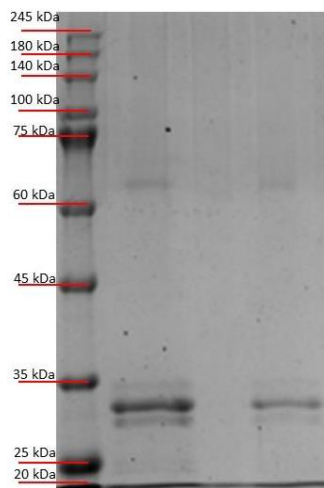


Figura 20: SDS-PAGE do veneno de *L. intermedia* utilizado neste experimento. Nota-se a demarcação de bandas, com destaque para a faixa demarcada aproximadamente na faixa entre 25 e 35 kDa.

A peçonha de aranha marrom possui uma composição molecular complexa, constituído por diversas toxinas proteicas, predominantemente de massa molecular entre 3 - 40 kDa (MARTINEZ-VARGAS, 1987; FUTRELL, 1992; DA SILVEIRA *et al.*, 2002; DE CASTRO *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; MOURA, 2005). A referência utilizada neste SDS-PAGE (245 a 20 kDa) não permite a identificação de proteínas de massa molecular abaixo de 20 kDa, por isso, algumas toxinas de baixo peso molecular, como, por exemplo, os peptídeos ICK (5,6 – 7.9 kDa) (GREMSKI *et al.*, 2020), não puderam ser identificadas. Utilizando referências estudos anteriores, nesta amostra de veneno, foi possível identificar proteínas de peso molecular similares às encontradas em estudos anteriores, que também realizaram a análise de perfis eletroforéticos de veneno de aranhas marrons, principalmente de *L. intermedia* (Quadro 4).

Quadro 4: Proteínas demarcadas (+) no SDS-PAGE realizado com o veneno de *L. intermedia* utilizado neste experimento, de acordo com a massa molecular em kDa.

Massa molecular kDa	Bandas demarcadas
245 – 180	
180 – 100	
100 – 75	+
75 – 60	+
60 – 45	
45 – 35	+
35 – 25	+
25 – 20	+
< 20	

Nas bandas entre 20-37 kDa, podem estar concentradas metaloproteases, como a Loxolisina A (20–28 kDa) e Loxolisina B (32–35 kDa) (TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Também nesta faixa, se encontra o principal componente tóxico do veneno loxoscélico, a Fosfolipase D (30-37 kDa) (VAN MEERTEN *et al.*, 2004), o que justifica a alta concentração proteica observada no SDS-PAGE. Entre 37 e 50 kDa, se concentram as hialuronidases (41-44 kDa) e as Proteínas Tumoriais Translacionalmente Controladas (TCTP) (46 kDa) (BARBARO *et al.*, 2005). Dentre as proteínas de alto peso molecular identificadas, entre 75 e 100 kDa, podem ser apontadas as serina-proteinases (81-90 kDa) (GREMSKI *et al.*, 2010). Proteínas demarcadas nas faixas de peso molecular superior a 100 kDa não correspondem às toxinas loxoscélicas identificadas até o momento. Segundo Bednaski *et al.* (2015), estas podem ser identificadas como proteínas pertencentes à hemolinfa do aracnídeo.

A realização de SDS-PAGE da urina das cobaias também assume um importante papel complementar na análise da proteinúria identificada através da urinálise. Apesar de a RP/C ser uma importante ferramenta para análise da proteinúria, a avaliação do perfil eletroforético urinário é um exame complementar de grande valia, uma vez que, através dela, é possível analisar qualitativamente as proteínas presentes na urina. Para isso, o uso do SDS-PAGE é considerado padrão

ouro para esta análise, uma vez que é capaz de identificar o peso molecular (PM) ao invés do ponto isoelétrico das proteínas, conferindo maior especificidade e sensibilidade (KANEKO, 1997, REGO *et al.* 2001; ZARAGOZA *et al.* 2003, LEES *et al.* 2005; GIORI *et al.* 2011).

Segundo Zaragoza *et al.* (2003), lesões em diferentes localizações dos néfrons resultam em padrões específicos em relação aos pesos moleculares encontrados para as proteínas urinárias. A perda de proteínas de alto peso molecular, chamada de proteinúria macromolecular (> 60 KDa), tem sido associada a lesões glomerulares. Já a perda de proteínas de baixo peso molecular (< 60 KDa), ou proteinúria micromolecular, se correlaciona à danos tubulares e/ou intersticiais (SCHULTZE e JENSEN, 1998). A partir disso, é possível classificar a proteinúria em três padrões: glomerular, tubular e mista (LE BRICON *et al.*, 1998).

Quando há proteinúria glomerular, significa que as barreiras de filtração estão lesionadas. O padrão glomerular geralmente é caracterizado pela perda da albumina sérica na urina associada com proteínas de tamanho semelhante, como antitrombina, transferrina, α 1-glicoproteína ácida e α 1-antitripsina. Por meio desse padrão é possível detectar a gravidade da lesão glomerular quando há presença de proteínas maiores, como a α 2-macroglobulina e a lipoproteína β (SODRÉ *et al.*, 2007; SCHAEFER *et al.*, 2011).

Quanto a proteinúria tubular, verifica-se ausência de reabsorção proteica nos túbulos, o que torna possível o encontro de proteínas de baixo peso molecular (GRAUER, 2005; BARROS *et al.*, 2006). As proteínas observadas são α 1-microglobulina, β 2-microglobulina, globulinas da fração β e as cadeias leves de imunoglobulinas, proteínas de ligação ao retinol e α 1-glicoproteína ácida (MARSHALL e WILLIAMS, 1999; SODRÉ *et al.*, 2007). A proteinúria de padrão tubular também pode ser observada em quadros sistêmicos como nos casos de hemólise intravascular (hemoglobinúria) e rabdomiólise (mioglobulinúria). Ademais, a proteinúria mista é caracterizada pela perda de frações proteicas tanto em nível tubular quanto glomerular (SODRÉ *et al.* 2007).

Diante desse contexto, foram realizados SDS-PAGE das urinas coletadas dos animais deste experimento, para identificação da localização da injúria renal (glomerular, tubular/intersticial ou mista) após o envenenamento por *L. intermedia*. Uma particularidade da urina das cobaias é que, mesmo em condições normais,

animais hígidos podem apresentar uma proteinúria considerável (Chernochova *et al.*, 2020). Dessa forma, o perfil eletroforético dos animais controle foi realizado para caracterização e estabelecimento de parâmetro esperado para esta espécie. Nestes animais, é possível observar uma prevalência de proteínas, com marcação de banda predominante estabelecida entre 75-60 e 60-45 kDa. No Controle 1 (C1) (Figura 16 e Quadro 4), observa-se, além da proteína citada anteriormente, a presença de proteínas entre 25 a 20 kDa, em menor concentração. Já no Controle 2 (C2) (Figura 17 e Quadro 5), quando apresentada, nota-se somente a marcação da proteína demarcada entre 25-20 kDa.

Quadro 5: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia (controle 1) no SDS-PAGE, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).

Massa molecular kDa	T1	T12	T24	T48	T72
245 – 180					
180 – 100					
100 – 75					
75 – 60				+	+
60 – 45					
45 – 35					
35 – 25					
25 – 20	+	+	+	+	+
< 20					

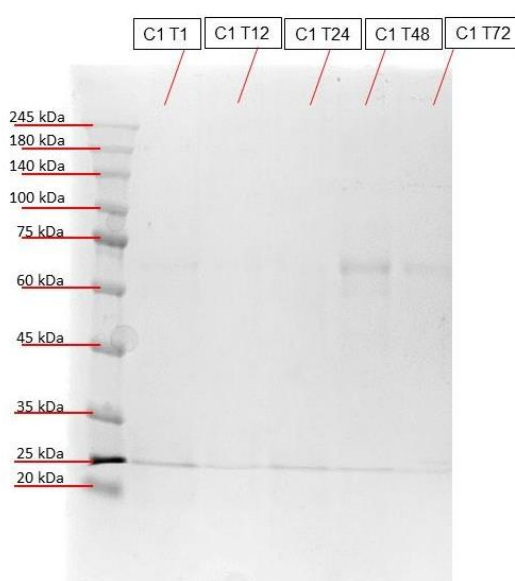


Figura 21: SDS-PAGE das urinas do animal controle (C1), coletadas em T1, T12, T24, T48 e T72. **C1/T1:** Nota-se a demarcação das bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular, entre 25-20 kDa. **C1/T12 e C1/T24:** Manutenção da demarcação das bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular. **C1/T48:** Demarcação das bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular, entre 25-20 kDa e de bandas referentes às proteínas de alto peso molecular, entre 60 - 75 kDa. **C1/T72:** Sem alterações em relação ao observado em 48 horas.

Quadro 6. Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia (controle 2) no SDS-PAGE, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12) e 24h (T24).

Massa molecular kDa	T1	T12	T48
245 – 180			
180 – 100			
100 – 75			
75 – 60			
60 – 45			
45 – 35			
35 – 25			
25 – 20		+	+

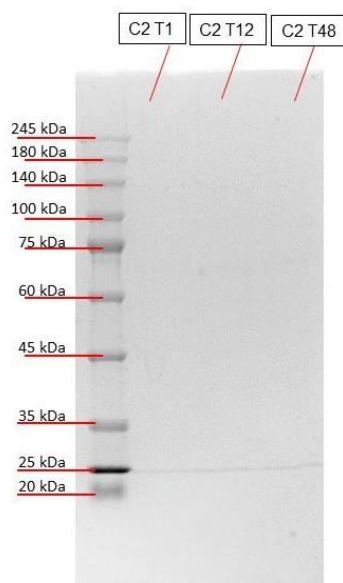


Figura 22: SDS-PAGE das urinas do animal controle (C2), coletadas em T1, T12, T24. **C2/T1:** Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **C2/T12:** Nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 25 kDa. **C2/T48:** sem alterações em relação à T12.

Os resultados das análises eletroforéticas dos animais tratados com aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia* estão apresentados nas Figuras 18 a 32 e Quadros 7 a 22.

Quadro 7. Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 11,627 µg veneno de *Loxosceles intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).

Massa molecular kDa	T1	T24	T48	T72
245 – 180		+	+	
180 – 140				
140 - 100		+	+	+
100 – 75				
75 – 60		+	+	+
60 – 45		+	+	+
45 – 35		+	+	+
35 – 25				+
25 – 20				

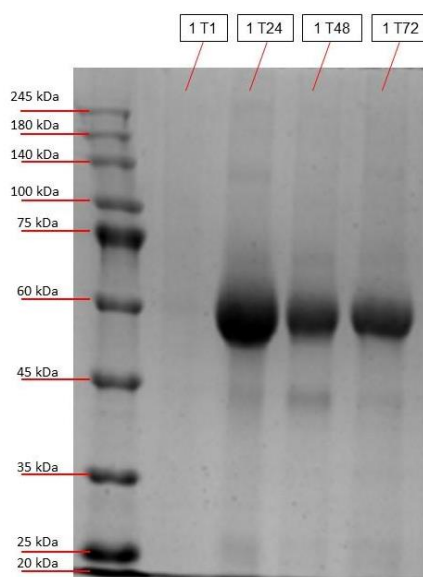


Figura 23: SDS-PAGE das urinas do animal 1 (11,627 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. **1/T1:** Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **1/T24:** Após 24 horas, nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-35, 45-35 e 25-20 kDa, e proteínas de alto peso molecular, entre 75-60, 140-100 e 245-180 kDa. Há aumento de concentração expressiva de proteínas de peso molecular próximo à 60 kDa. **1/T48 e 1/T72:** Após 48 horas não foram observadas alterações significativas em relação a T24.

Quadro 8. Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 12,789 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).

Massa molecular kDa	T1	T24	T48	T72
245 – 180				
180 – 140				
140 - 100		+		+
100 – 75				
75 – 60		+	+	+
60 – 45		+	+	+
45 – 35		+	+	+
35 – 25		+	+	+
25 – 20		+	+	+

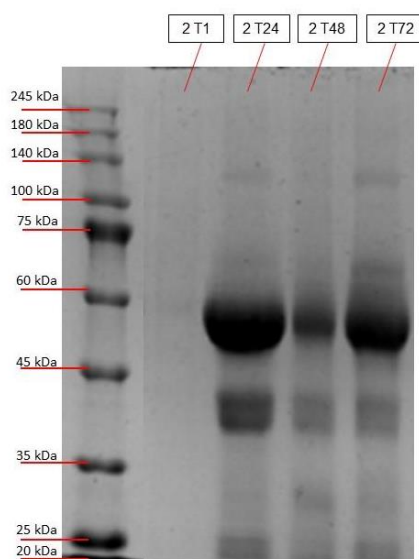


Figura 24: SDS-PAGE das urinas do animal 2 (12,789 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. **2/T1:** Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **2/T24:** Após 24 horas, nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-45, 45-35, 35-25 e 25-20 kDa, e proteínas de alto peso molecular, entre 75-60 e 140-100 kDa. **2/T48:** Após 48 horas, houve aumento na proteinúria observada em relação ao T24. **2/T72:** Após 72 horas, houve diminuição da concentração proteica, porém a demarcação de proteínas de alto e baixo peso molecular se manteve.

Quadro 9: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 14,068 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).

Massa molecular kDa	T1	T24	T48	T72
245 – 180				
180 – 140				
140 – 100		+	+	
100 – 75				
75 – 60		+	+	+
60 – 45		+	+	+
45 – 35		+	+	+
35 – 25			+	
25 – 20		+	+	+

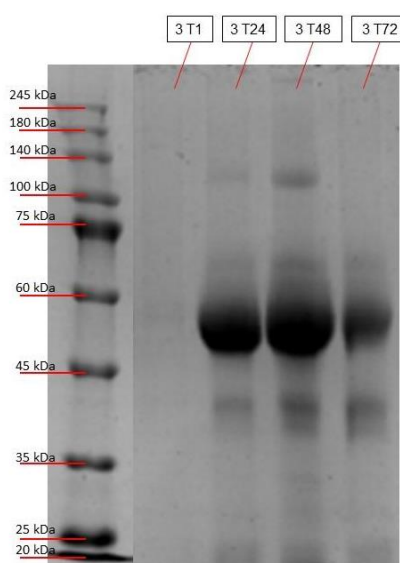


Figura 25: SDS-PAGE das urinas do animal 3 (14,068 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. **3/T1:** Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **3/T24:** Após 24 horas, nota-se a demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-45, 45-35 e 25-20 kDa, e proteínas de alto peso molecular, entre 140-100 kDa. Há aumento de concentração expressiva de proteínas, porém, com destaque entre 60-45 kDa. **3/T48:** Após 48 horas, manutenção da presença de proteínas, em relação à 24 horas. **3/T72:** Após 72 horas, não foi mais observada a presença de proteínas demarcadas entre 140-100 kDa.

Quadro 10: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 15,475 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48) e 72h (T72).

Massa molecular kDa	T1	T24	T48	T72
245 – 180		+		
180 – 140		+	+	+
140 – 100		+		
100 – 75				
75 – 60				
60 – 45	+	+	+	+
45 – 35		+	+	+
35 – 25		+	+	
25 – 20		+	+	

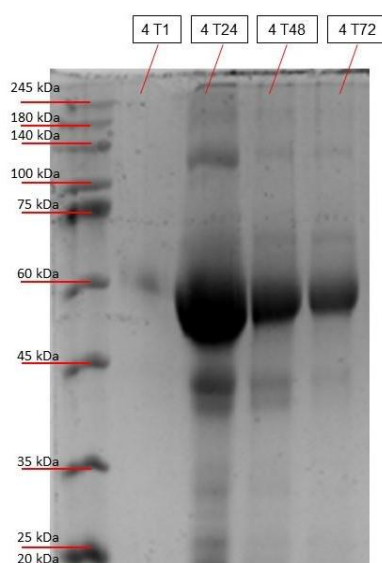


Figura 26: SDS-PAGE das urinas do animal 4 (15,475 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. **4/T1:** Observa-se discreta presença de proteínas de peso molecular de aproximadamente 60 kDa. **4/T24:** Após 24 horas, nota-se demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular entre 60-45, 45-35, 35-25 e 25-20 kDa e discreta demarcação entre 25-20 kDa, e considerável demarcação de proteínas de alto peso molecular, entre 250-60 kDa. **4/T48:** Após 48 horas, observa-se diminuição da concentração proteica, porém, mantendo-se as mesmas demarcações de peso molecular em relação a T24. **4/T72:** Após 72 horas, a presença de proteínas de alto peso molecular manteve-se, porém, não foram mais observadas proteínas de baixo peso molecular abaixo de 35 Kda.

Quadro 11: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 17,795 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 24h (T24), 48h (T48), 72h (T72)

Massa molecular kDa	T1	T24	T48	T72
245 – 180		+	+	+
180 – 140				
140 – 100		+	+	+
100 – 75				
75 – 60		+	+	+
60 – 45		+	+	+
45 – 35				
35 – 25		+		
25 – 20		+	+	+

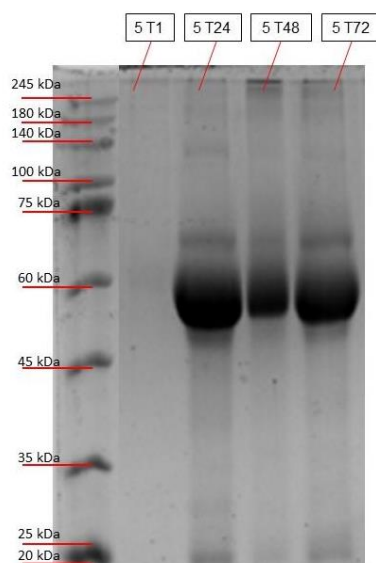


Figura 27: SDS-PAGE das urinas do animal 5 (17,795 µg), coletadas em T1, T24, T48 e T72. **5/T1:** Nota-se discreta demarcação de bandas referentes a proteínas de baixo peso molecular de aproximadamente 60 kDa. **5/T24:** Após 24 horas, proteinúria considerável, com destaque para a faixa entre 60-45 kDa. Nota-se presença de proteínas de alto peso molecular, entre 245-180, 140-100 e 75-60 kDa e proteínas de baixo peso molecular, entre 60-45, 35-25, 25-20 e abaixo de 20 kDa. **5/T48:** Após 48 horas, observa-se diminuição da concentração proteica. Não é observada a presença de proteínas de baixo peso molecular entre 35-25 kDa. **5/T72:** Após 72 horas, não foram observadas alterações significativas em relação à T48.

Quadro 12: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 18,725 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12), 48h (T48) e 72h (T72)

Massa molecular kDa	T1	T12	T48	T72
245 – 180		+	+	+
180 – 140				
140 – 100		+	+	+
100 – 75				
75 – 60				+
60 – 45		+	+	+
45 – 35				
35 – 25				
25 – 20				+

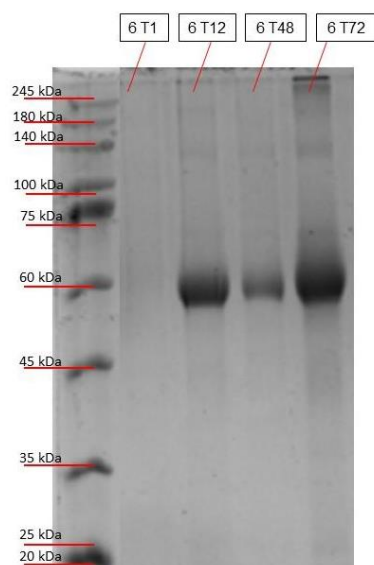


Figura 28: SDS-PAGE das urinas do animal 6 (18,725 µg), coletadas em T1, T12, T48 e T72. **6/T1:** Não foi observada demarcação de bandas, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **6/T12:** Nota-se discreta demarcação de proteínas de alto peso molecular entre as bandas 245-180 e 140-100 kDa, porém, grande concentração proteica destacada entre as bandas 60-45 kDa. **6/T48:** Após 48 horas, observa-se diminuição da concentração proteica, porém, mantendo-se as mesmas demarcações de peso molecular em relação a T24. **6/T72:** Após 72 horas, houve aumento na proteinúria, com destaque para proteínas de alto peso molecular, entre 245-180, 140-100 e 75-60 kDa, mantendo-se a

principal concentração proteica entre 60-45 kDa e apresentando demarcação de banda entre 25-20 kDa.

Quadro 13: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 21,533 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 24h (T24)

Massa molecular kDa	T1	T24
245 – 180		
180 – 140		
140 – 100		
100 – 75		
75 – 60		
60 – 45	+	+
45 – 35		
35 – 25		
25 – 20		

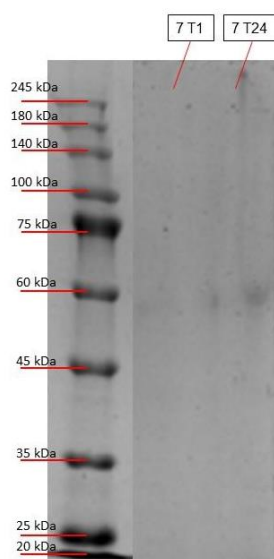


Figura 29: SDS-PAGE das urinas do animal 7 (21,533 µg), coletadas em T1 e T24. **7/T1:** Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. **7/T24:** Após 24 horas, observa-se aumento da concentração proteica na urina, destacando-se a banda 60-45 kDa.

Quadro 14: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 24,762 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 12h (T12).

Massa molecular kDa	T1	T12
245 – 180		
180 – 140		
140 – 100		
100 – 75		
75 – 60		+
60 – 45		
45 – 35		
35 – 25		
25 – 20		

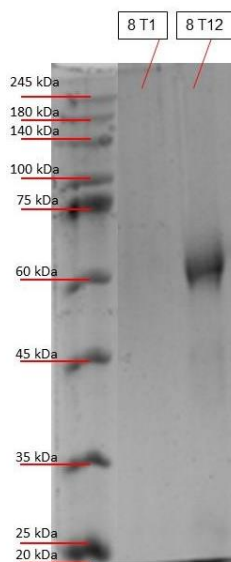


Figura 30: SDS-PAGE das urinas do animal 8 (24,762 µg), coletadas em T1 e T24. **8/T1:** Não foi observada demarcação de banda, o que sugere a ausência de proteínas de peso molecular entre 245 kDa e 20 kDa. **8/T12:** Após 24 horas, observa-se a presença de concentração proteica na urina, destacando-se a banda 75-60 kDa.

Quadro 15: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 29,995 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 2h (T2) e 24h (T24).

Massa molecular kDa	T1	T2	T24
245 – 180			
180 – 140			
140 – 100			
100 – 75			
75 – 60			+
60 – 45	+	+	+
45 – 35			+
35 – 25			+
25 – 20			+

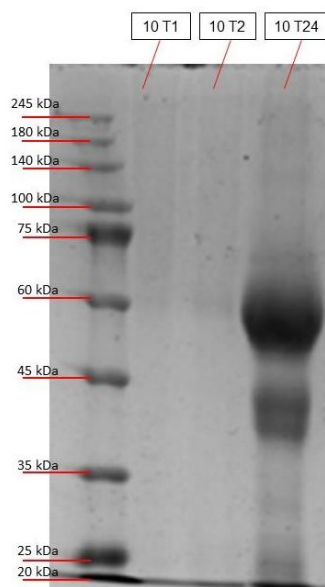


Figura 31: SDS-PAGE das urinas do animal 10 (29,995 µg), coletadas em T1, T2 e T24. **10/T1:** Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. **10/T2:** Não foram observadas alterações em relação à T1. **10/T24:** Após 24 horas, aumento generalizado da concentração de proteínas de 245-20 kDa, principalmente de alto peso molecular.

Quadro 16: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 47,985 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 24h (T24).

Massa molecular kDa	T1	T24
245 – 180		
180 – 140		
140 – 100		
100 – 75		
75 – 60		+
60 – 45	+	+
45 – 35		+
35 – 25		+
25 – 20		+

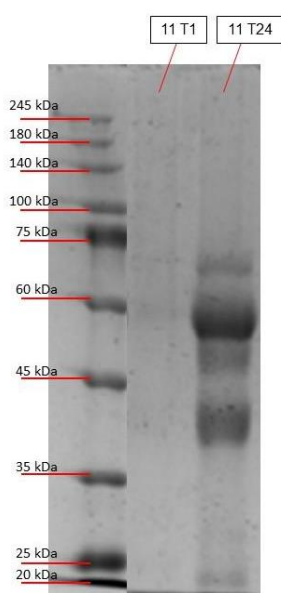


Figura 32: SDS-PAGE das urinas do animal 11 (47,985 µg), coletadas em T1 e T24. **11/T1:** Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. **11/T24:** Após 24 horas, aumento da concentração de proteínas entre 60-45 kDa e presença de proteínas de alto e baixo peso molecular, entre 75-20 kDa.

Quadro 17: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 76,775 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 24h (T24)

Massa molecular kDa	T1	T12	T24
245 – 180			+
180 – 140			+
140 – 100			+
100 – 75			+
75 – 60			+
60 – 45	+	+	+
45 – 35			+
35 – 25			+
25 – 20			+

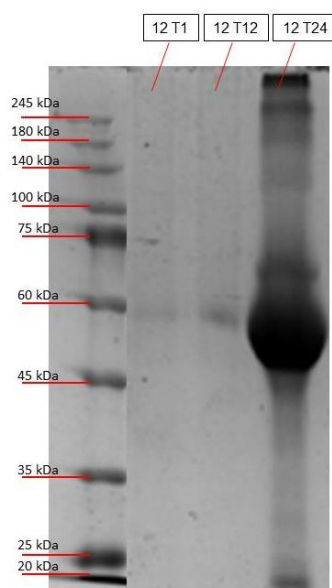


Figura 33: SDS-PAGE das urinas do animal 12 (76,775 µg), coletadas em T1, T12 e T24. **12/T1:** Nota-se discreta demarcação de bandas referentes a proteínas de peso molecular de aproximadamente 60 kDa. **12/T12:** Não foram observadas alterações em relação à T1. **12/T24:** Após 24 horas, aumento generalizado da concentração de proteínas de alto e baixo peso molecular entre 245-20 kDa.

Quadro 18: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 105 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12), 24 h (T24) e TF (tempo final)

Massa molecular kDa	T1	T12	T24
245 – 180			+
180 – 140			+
140 – 100			+
100 – 75			
75 – 60			+
60 – 45	+	+	+
45 – 35			+
35 – 25			+
25 – 20			+

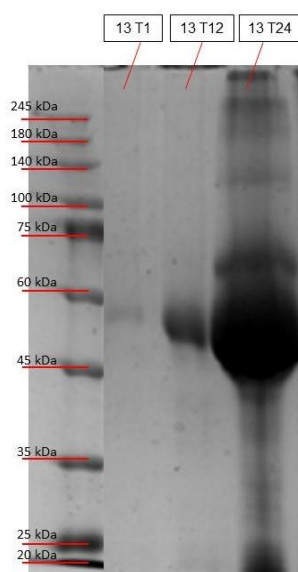


Figura 34: SDS-PAGE das urinas do animal 13 (105 µg), coletadas em T1 e T12. **13/T1:** Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. **13/T12:** Aumento da proteinúria demarcada entre 60-45 kDa. **13/T24:** Presença considerável de proteínas de alto e baixo peso molecular, com destaque para a faixa entre 60-45 kDa.

Quadro 19: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 140 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1) e 12h (T12)

Massa molecular kDa	T12	T24
245 – 180		+
180 – 140		+
140 – 100		+
100 – 75		+
75 – 60		+
60 – 45	+	+
45 – 35	+	+
35 – 25	+	+
25 – 20	+	+

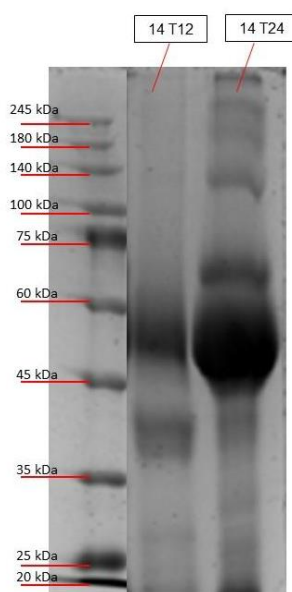


Figura 35: SDS-PAGE das urinas do animal 14 (140 µg), coletadas em T12 e T24. **14/T12:** Presença de proteínas de baixo peso molecular entre 60-20 kDa, com destaque para a faixa demarcada entre 60-45 kDa. **14/T24:** Observa-se um aumento considerável da proteinúria, com a presença de proteínas de alto e baixo peso molecular, entre 245-20 kDa. O destaque manteve-se entre 60-45 kDa.

Quadro 20: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 210 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 1h (T1), 12h (T12) e 24h (T24)

Massa molecular kDa	T1	T12	T24
245 – 180			+
180 – 140			+
140 – 100			+
100 – 75			
75 – 60			+
60 – 45	+	+	+
45 – 35		+	
35 – 25			
25 – 20		+	

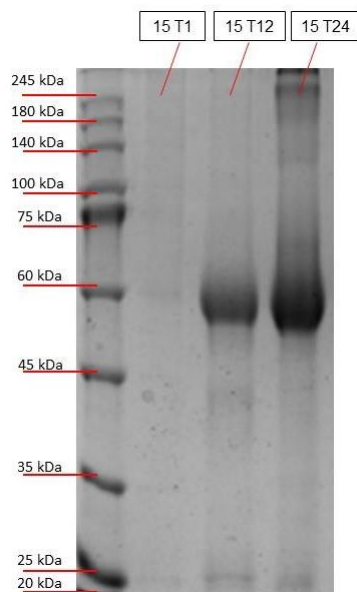


Figura 36: SDS-PAGE das urinas do animal 15 (210 µg), coletadas em T1, T12, T24 e TF. **15/T1:** Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. **15/T12:** Aumento da concentração de proteinúria de baixo peso molecular, com destaque na concentração de proteínas na banda 60-45 kDa. Nota-se também proteínas entre 45-35 e 25-20 kDa. **15/T24:** Observa-se a presença de proteínas de alto peso molecular. Porém, devido à densidade proteica da urina, durante o preparo da amostra para a eletroforese, essa se solidificou, o que pode resultar em interferência dos resultados.

Quadro 21: Proteínas demarcadas (+) na urina de cobaia no SDS-PAGE, após inoculação intradérmica de 350 µg veneno de *L. intermedia*, de acordo com a massa molecular em kDa nos tempos 12h (T12) e 24h (T24)

Massa molecular kDa	T12	T24
245 – 180		+
180 – 140		+
140 – 100		+
100 – 75		+
75 – 60		+
60 – 45	+	+
45 – 35		+
35 – 25		+
25 – 20		+

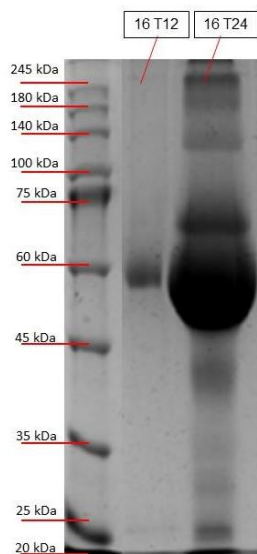


Figura 37: SDS-PAGE das urinas do animal 16 (350 µg), coletadas em T12, T24. **16/T12:** Nota-se discreta demarcação entre as bandas 60-45 kDa. **16/T24:** Aumento expressivo da concentração de proteinúria de alto e baixo peso molecular entre 245-20 kDa. Com destaque para a faixa entre 60-45 kDa.

Com a análise dos resultados dos perfis eletroforéticos, é possível aventar que a localização das lesões renais causadas pelo veneno de *L. intermedia* se dá tanto

nos glomérulos, quanto nos túbulos/interstício dos néfrons, uma vez que foram observadas a presença de proteínas de alto e baixo peso molecular.

Os animais desafiados somente com solução fisiológica 0,9% apresentarem discreta proteinúria com predomínio de proteínas de baixo peso molecular. Entretanto, a concentração e a presença de proteínas na urina dos animais envenenados com veneno de *L. intermediam* foi notadamente maior, sendo possível, então, apontar alterações a nível tubular/intersticial. Além disso, a lesão renal, especialmente glomerular, aparenta apresentar uma dependência da dose de veneno injetada, uma vez que quanto maior a dosagem, maior a concentração de proteínas de alto peso molecular na urina em menores períodos de tempo. Ademais, a principal proteína liberada na urina, no geral, está localizada na banda eletroforética entre 75-45 kDa.

5. Eletrocardiograma

O eletrocardiograma (ECG) é um exame capaz de registrar as variações dos potenciais elétricos gerados pelo coração durante as diferentes fases do ciclo cardíaco. Essas mudanças são detectadas por um eletrocardiógrafo, através de eletrodos conectados à superfície corporal, gerando formas gráficas dos eventos de despolarização e repolarização do coração, que são expressos pelas ondas P, Q, R, S e T. Na medicina veterinária, segundo Tilley (1992), o eletrocardiograma é uma ferramenta diagnóstica essencial na avaliação de animais com distúrbios cardiovasculares, associado a outros achados clínicos e laboratoriais, sendo amplamente utilizado para identificar frequências cardíacas, anormalidades do ritmo, alterações de condução intraventricular e sinais de isquemia miocárdica, conforme também relatado por Santilli *et al.* (2018).

No tempo zero, todas as cobaias, apresentaram um ritmo regular sinusal (RRS) (Figura 38), considerado ritmo cardíaco fisiológico, com a ocorrência de uma onda P precedida por um complexo QRS (Tilley, 2004). Após o envenenamento, somente o animal 3 (28,477 μg) não apresentou alterações no traçado eletrocardiográfico, mantendo ritmo sinusal durante as 72 horas. No entanto, um ritmo sinusal pode ser diagnosticado mesmo na presença de arritmia ou distúrbio de condução caracterizado por um complexo QRS anormal (SANTILLI *et al.*, 2018).

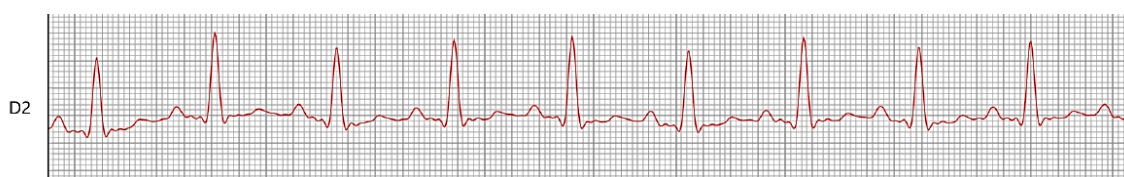


Figura 38: Traçado eletrocardiográfico evidenciando o ritmo sinusal de cobaia no tempo zero. Derivação D2, 50 mm/s, N.

Em algumas cobaias, na primeira hora após aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*, foram vistas alterações nos ECGs. No animal 2 (12,789 μg), foi observada a ocorrência de batimentos sinusais, juncionais e extrassístole atrial. Nos animais 4 (15,475 μg), 6 (18,725 μg), 7 (21,533 μg), 8 (24,762 μg) e 9 (28,477 μg) foram observadas extrassístoles atriais.

Após 12 horas, os animais 6 (18,725 µg) e 7 (21,533 µg), apresentaram extrassístoles atriais. Nos animais 8 (24,762 µg) e o animal 9 (28,477 µg) foram vistas extrassístoles ventriculares com ocorrência de batimento juncional.

Um dia após a aplicação do veneno de *L. intermedia*, o animal 1 (11,627 µg), apresentou batimentos juncionais e dissociação atrioventricular. No animal 2 (12,789 µg), notou-se a ocorrência arritmia juncional. No animal 4 (47,985 µg), observou-se extrassístole atrial isolada.

Posteriormente às primeiras 48 horas, o animal 1 (11,627 µg), manteve o quadro observado após 24 horas do envenenamento. No animal 2 (12,789 µg), houve a manutenção da arritmia juncional, com presença de extrassístoles atriais isoladas. No animal 4 (15,475 µg), notou-se a ocorrência de pré-excitação ventricular. No animal 6 (18,725 µg), observaram-se extrassístoles atriais isoladas e episódios de taquicardia atrial focal. Por fim, após 72 horas, ocorreram alterações eletrocardiográficas apenas no animal 1 (11,627 µg), com a presença de extrassístoles atriais isoladas.

Segundo Dias-Lopes *et al.* (2010), o veneno de *L. intermedia*, em especial a fração esfingomielinase-D, causa efeitos cardiotoxicos, que desempenham um importante papel no quadro do loxoscelismo sistêmico. Em cardiomiócitos de ratos tratados com veneno de *L. intermedia*, foi observada menor tensão sistólica, com consequente diminuição da contratilidade cardíaca (BERS e GUO, 2005). Trabalhos anteriores também demonstraram que a esfingomielina pode mediar uma variedade de efeitos inotrópicos e cronotrópicos agudos no coração, que podem resultar em alterações de função cardíaca (Colina *et al.*, 2005). Esses efeitos, portanto, poderiam ser apontados como os responsáveis pelas alterações eletrocardiográficas observadas nas cobaias, bem como nas alterações dos níveis de CK, CK-MB e Troponina I.

As principais alterações observadas ao ECG, e sua origem estão descritas no quadro 22. O aparecimento dessas alterações comprovam o desenvolvimento de disfunções cardíacas após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*.

Quadro 22: Alterações eletrocardiográficas observadas após o envenenamento experimental com peçonha de *L. intermedia* em cobaias, e sua provável origem

Alteração Eletrocardiográfica	Origem
Batimentos Juncionais (Figura 39 e 43)	Batimento ectópico precoce originado na junção atrioventricular.
Ritmo Juncional	Trata-se de ritmo de suplência ou de substituição originado na junção atrioventricular.
Extrassístoles Atriais Isoladas (Figura 40)	Batimento ectópico atrial precoce.
Extrassístole Ventricular (Figura 41 e 42)	Apresenta-se como batimento originado precocemente no ventrículo, com pausa pós-extrassistólica. Em envenenamentos, as extrassístoles ventriculares estão associadas a danos nas fibras musculares cardíacas pela atividade miotóxica e pelo comprometimento da perfusão dos tecidos cardíacos.
Dissociação Atrioventricular (Figura 43)	Ocorrência de dois ritmos dissociados, sendo um atrial, geralmente sinusal, com intervalo PP regular e outro de origem juncional ou ventricular.
Pré-excitação Ventricular	Ocorre comumente quando uma via acessória anômala que se desvia de parte ou de todo o sistema de condução normal, toma parte na propagação do impulso elétrico.

Fonte: PASTORE *et al*, 2016; SANTILLI *et al*, 2018.



Figura 39: Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de batimento juncional, circulada em preto.

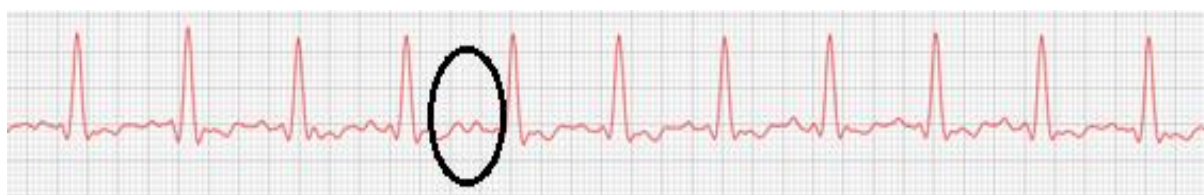


Figura 40: Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de extrassístole atrial isolada, circulada em preto.



Figura 41: Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de extrassístole ventricular isolada, circulada em preto, com provável origem em ventrículo direito.

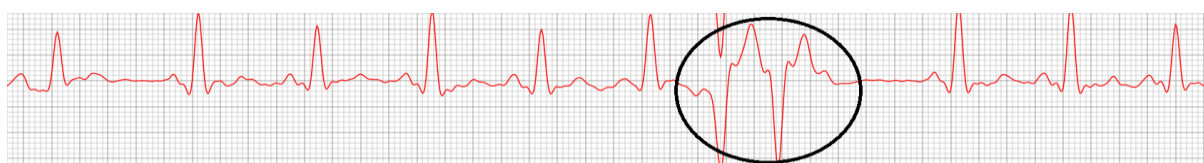


Figura 42: Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de extrassístoles ventriculares em par, circuladas em preto, com provável origem em ventrículo esquerdo

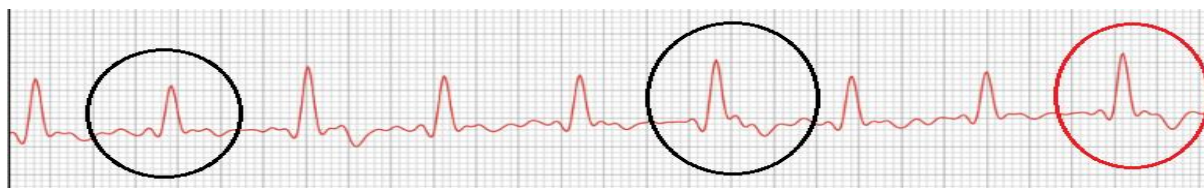


Figura 43: Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo sinusal de cobaia após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. Derivação D2, 50 mm/s, N. Nota-se a ocorrência de batimentos juncionais, circutados em preto, e dissociação atrioventricular, circulada em vermelho.

6. Alterações anátomo-histopatológicas

Todos os animais foram necropsiados após o óbito. Aqueles que não foram à óbito, incluindo os animais que serviram como controle, foram eutanasiados 72 horas após a aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia* ou solução salina 0,9% e também foram necropsiados. Durante a necropsia foram coletados fragmentos dos rins, coração e fígado para análises histopatológicas por microscopia óptica.

Macroscopicamente, foi possível observar alterações renais em todos os animais desafiados com o veneno de *L. intermedia*, como perda da definição cortico-medular e congestão (Figura 44). Alterações cardíacas e hepáticas também foram notadas em algumas das cobaias que também apresentaram alterações microscópicas significativas, como pode ser visto nas figuras 45 e 46.

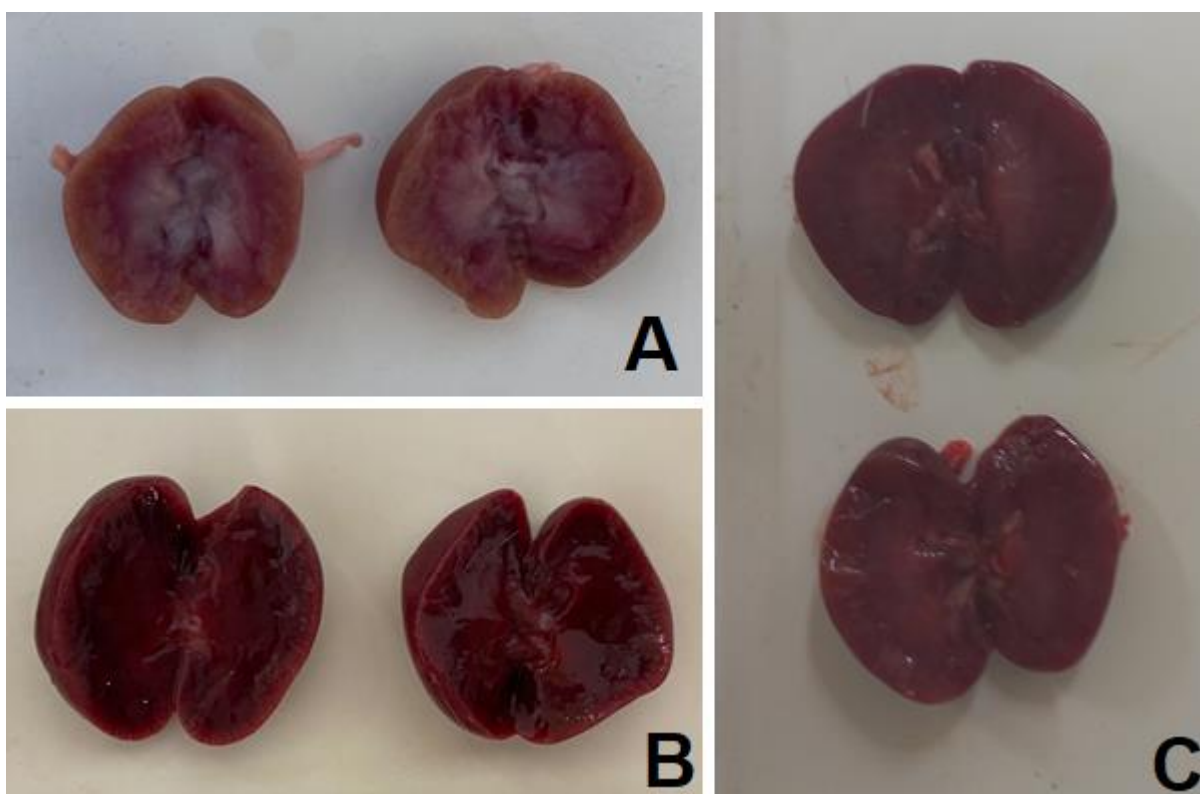


Figura 44: Corte sagital de rins de cobaias após aplicação intradérmica de soro fisiológico 0,9% / veneno de *L. intermedia*. **A:** Visão macroscópica renal de animal controle. Não foram observadas alterações dignas de nota. **B:** Visão macroscópica renal do animal 15 (210 µg de veneno de *L. intermedia*). Órgão aumentado de volume e vermelho-escuro (congestão). Perda de definição córtico-medular. **C:** Visão macroscópica renal de animal 2 (12,789 µg de veneno de *L. intermedia*). Observa-se diminuição da definição córtico-medular.

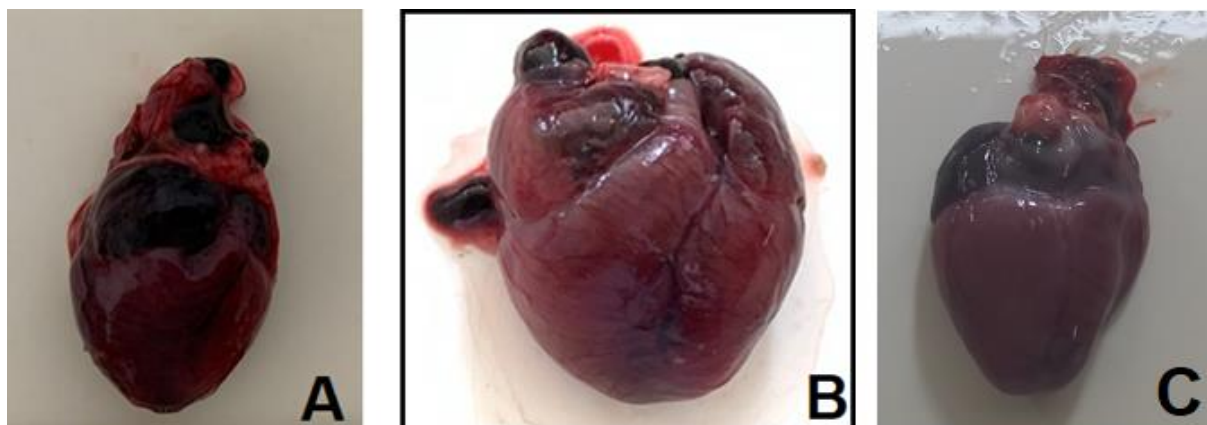


Figura 45: Coração de cobaia após aplicação intradérmica de soro fisiológico 0,9% / veneno de *L. intermedia*. **A:** Visão macroscópica cardíaca do animal 15 (210 μg de *L. intermedia*). Órgão aumentado de volume e vermelho-escuro (congestão); notam-se focos de hemorragia. **B:** Visão macroscópica cardíaca do animal 8 (24,762 μg de *L. intermedia*). Observa-se aumento de volume do órgão, que apresenta superfície espessa, com aspecto gelatinoso e brilhante, sugestivo de edema generalizado e congestão. **C:** Visão macroscópica cardíaca de animal controle. Não foram observadas alterações dignas de nota.

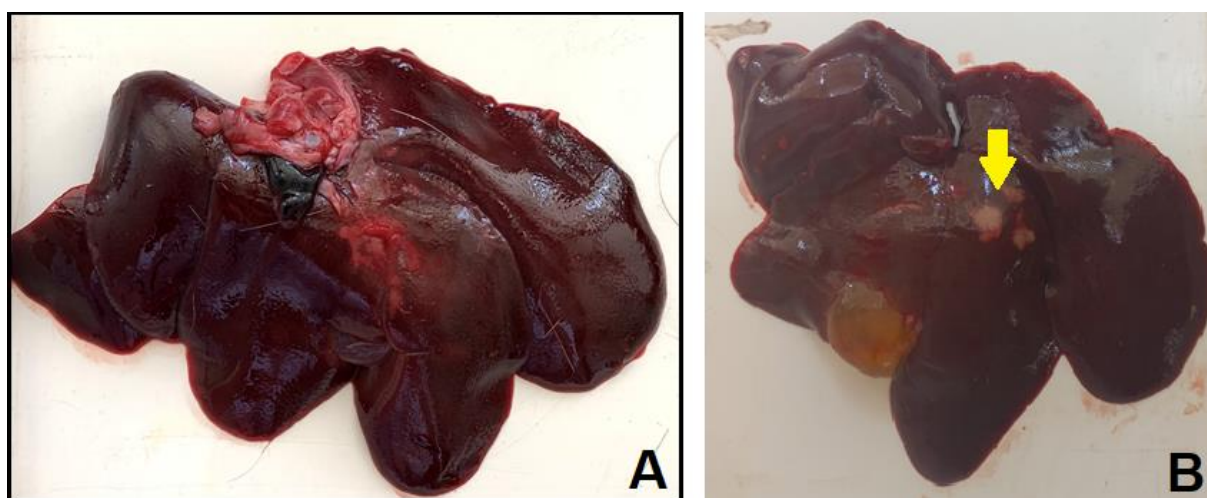


Figura 46: Fígado de cobaias após aplicação intradérmica de veneno de *L. intermedia*. **A:** Visão macroscópica hepática do animal 9 (28,477 μg de veneno de *L. intermedia*). Não foram observadas alterações dignas de nota. **B:** Visão macroscópica hepática do animal 2 (12,789 μg de veneno de *L. intermedia*). Observam-se áreas arredondadas multifocais brancacentas, sugestivas de necrose hepática.

Na análise da microscopia óptica renal das cobaias após a inoculação de veneno de *L. intermedia*, nos animais 5 (17,795 μg), 6 (18,725 μg), 7 (21,533 μg), 8 (24,762 μg), 9 (28,477 μg), 10 (29,995 μg), 12 (47,985 μg), 13 (105 μg), 15 (210 μg) e 16 (350 μg), houve a ocorrência de necrose tubular aguda causada por degeneração

vacuolar nos túbulos proximais e distais. Dentre eles, as cobaias 7 (21,533 µg), 10 (29,995 µg), 12 (47,985 µg), 13 (105 µg), 15 (210 µg) e 16 (350 µg) apresentaram dilatação de túbulos contorcidos proximais e distais devido à deposição de material hialino nessas estruturas, sugestivo de acúmulo proteico. Nos animais 2 (12,789 µg) e 11 (47,985 µg), estas alterações também foram observadas, porém, sem a ocorrência de processos degenerativos tubulares associados.

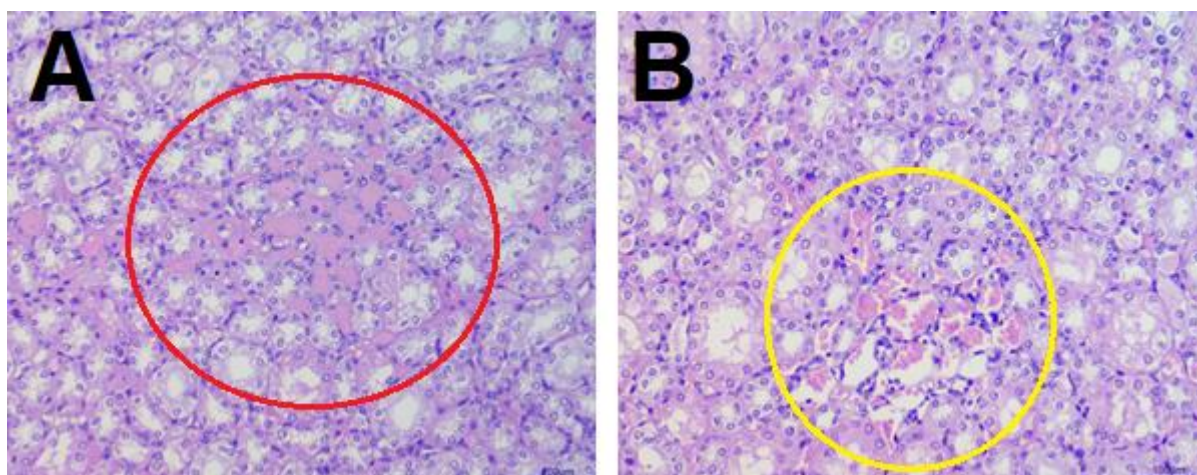


Figura 47. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 12,789 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 2), após coloração HE. **A:** Aumento 200x. Dilatação de túbulos distais e proximais devido à acúmulo de material amorfo eosinofílico (sugestivos de proteína) multifocal moderada (demarcados por círculo em vermelho). **B:** Aumento 200x. Hemorragia cortical e medular multifocal discreta (circulada em amarelo).

Nos animais estudados neste experimento, alterações glomerulares também puderam ser apontadas. A ocorrência de degeneração glomerular ocorreu nos animais 7 (21,533 µg), 12 (47,985 µg), 14 (140 µg) e 16 (350 µg). Hialinização do espaço de Bowman também pôde ser observada nos animais nos animais, 12 (47,985 µg), 15 (210 µg) e 16 (350 µg). Estas alterações estão demonstradas nas figuras 47 a 58:

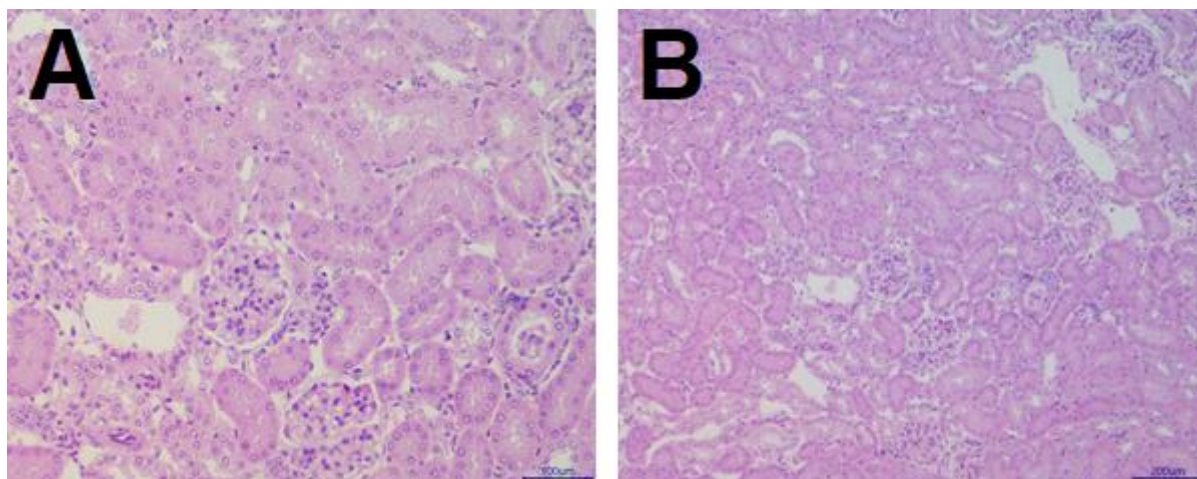


Figura 48. Fotomicroscopias de rim de cobaias inoculada com 17,795 e 18,725 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animais 5 e 6), após coloração HE. Observa-se degeneração e necrose glomerular associada a degeneração e congestão corticomedular difusa acentuada e proteinúria difusa acentuada. Dilatação do espaço urinário com acúmulo de material amorfo eosinofílico (sugestivo de proteína). Vacuolização de túbulo proximal associada a acúmulo de material amorfo eosinofílico. **A:** aumento 200x. **B:** aumento 100x.

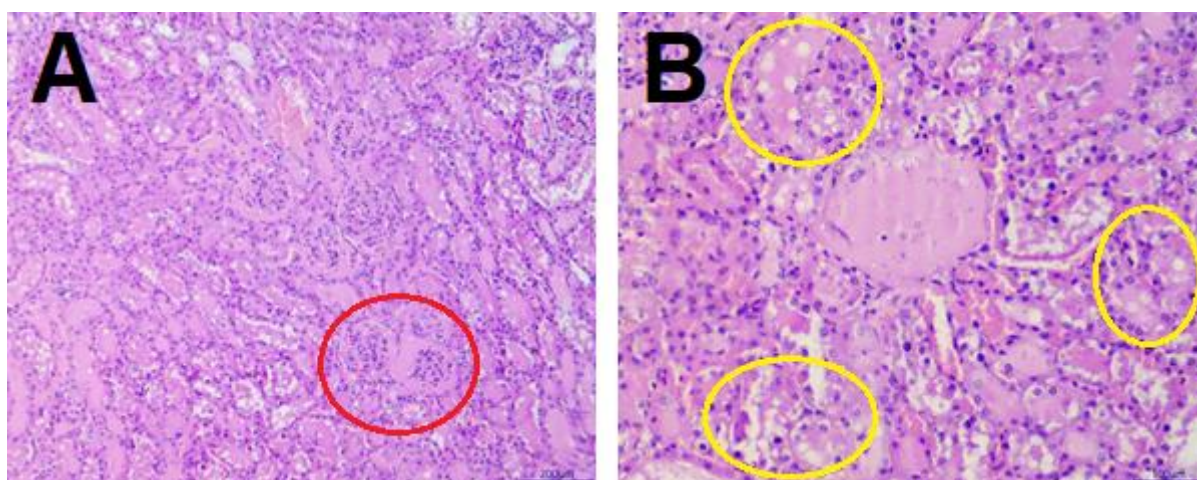


Figura 49. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 21,533 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 7), após coloração HE. **A:** Aumento 100x. Observa-se degeneração e necrose glomerular (em vermelho) associada à degeneração e congestão corticomedular e proteinúria difusa acentuada. Acentuada dilatação do espaço urinário, com acúmulo de material amorfo eosinofílico multifocal acentuado (proteína). **B:** Aumento 200x. Vacuolização de túbulo proximal associada a acúmulo de material amorfo eosinofílico (circuladas em amarelo).

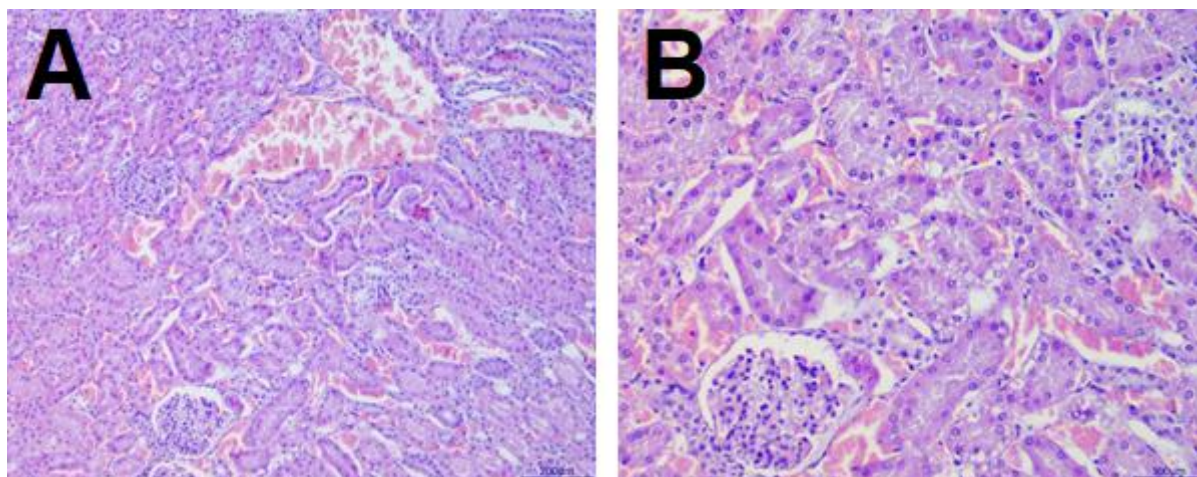


Figura 50. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 24,762 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE. Nota-se degeneração moderada de túbulo proximal associada a acentuada congestão glomerular e cortical multifocal acentuada. **A:** Aumento 100x. Vacuolização de túbulo proximal multifocal moderada. **B:** Aumento 200x. Congestão glomerular e cortical multifocal acentuada, com vacuolização glomerular.

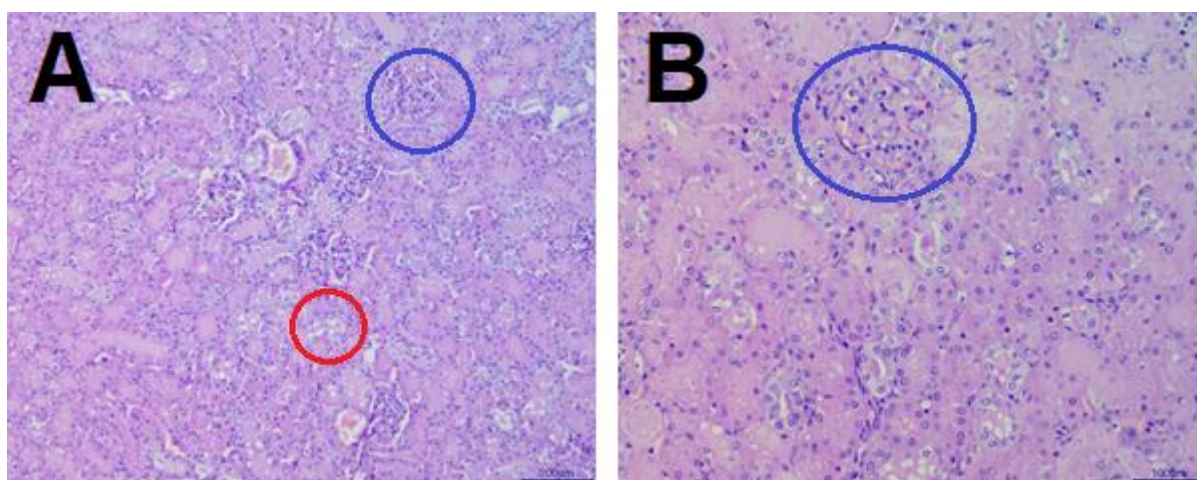


Figura 51. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 28,477 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 9), após coloração HE. Degeneração vacuolar de túbulo proximal multifocal moderada (em vermelho). Espessamento mesangial multifocal discreto (glomerulite membranosa), aderência glomerular a cápsula, multifocal discreto (demarcada em azul). Vacuolização de endotélio de túbulo proximal multifocal moderada. **A:** aumento 100x **B:** aumento 200x.

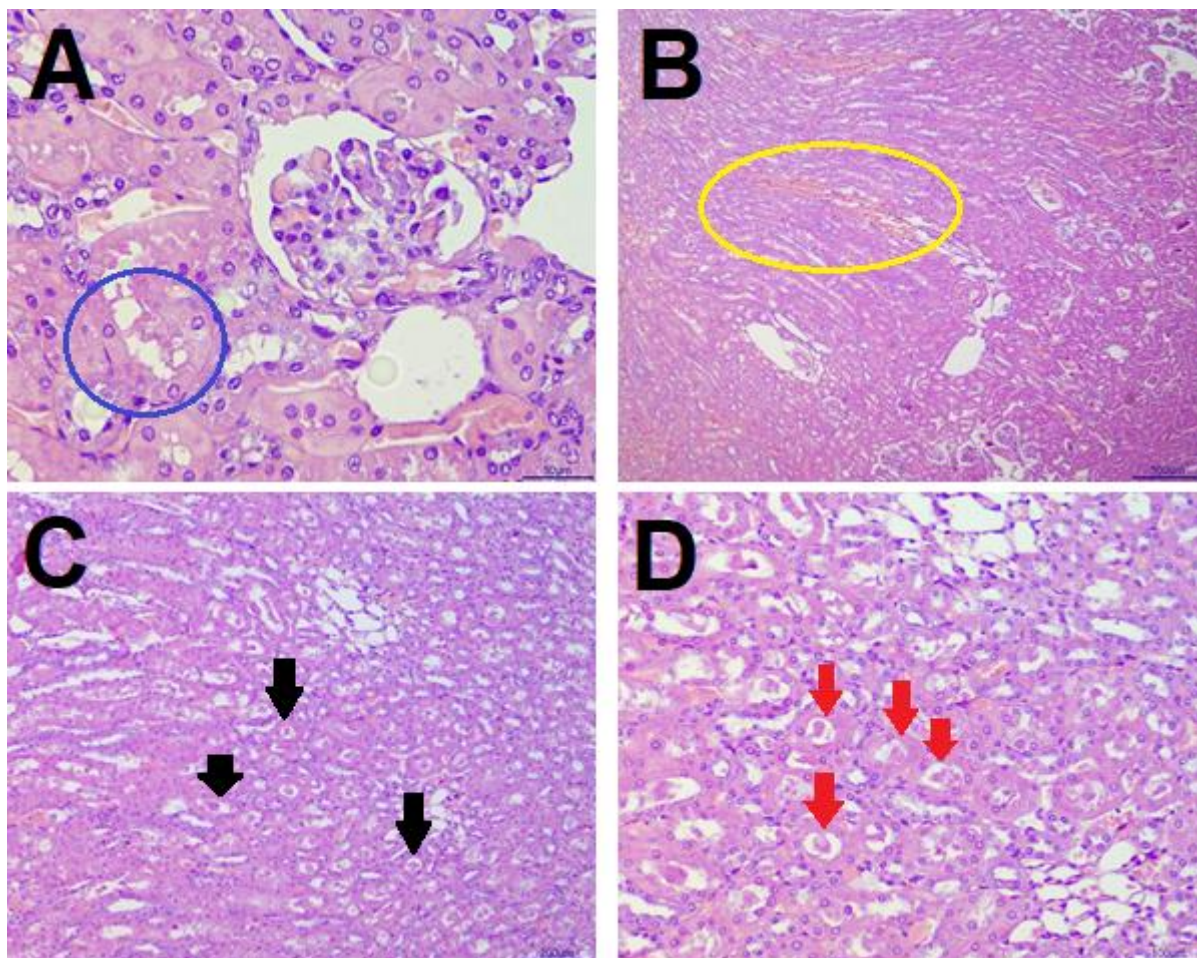


Figura 52. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 29,995 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 10), após coloração HE. **A:** Aumento 200x. Vacuolização de túbulo proximal multifocal discreta (demarcada em azul); **B:** Aumento 40x. Hiperemia multifocal moderada (circulada em amarelo); **C:** Aumento 100x. Degeneração de túbulo proximal e presença de cilindros hialinos multifocal moderado (setas pretas). **e D:** Aumento 200x. Túbulos distais apresentando restos de hemácias no lúmen (setas vermelhas) associadas à material amorfo eosinofílico multifocal moderado.

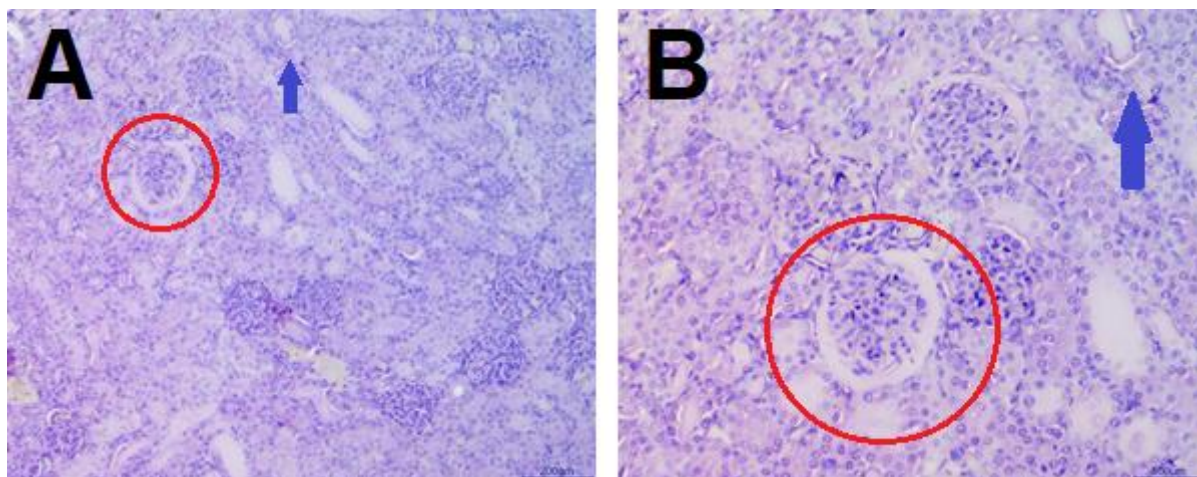


Figura 53. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 47,985 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 11), após coloração HE. Degeneração e dilatação do espaço urinário (círculos vermelhos) com formação de cilindros hialinos (setas azuis) multifocal moderada. Vacuolização de túbulos proximais multifocal discreta. **A:** aumento 100x. **B:** aumento 200x.

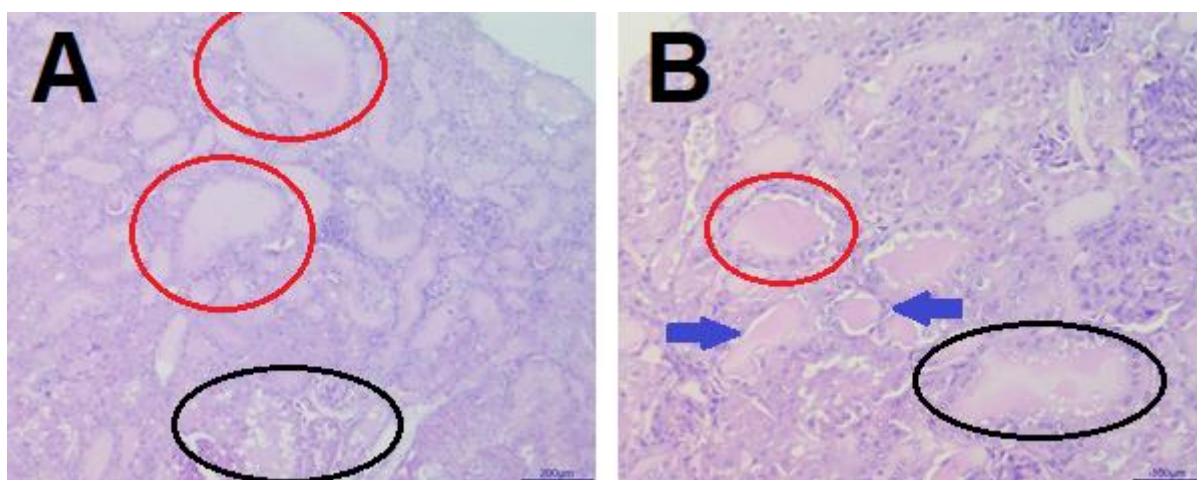


Figura 54. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 76,775 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 12), após coloração HE. Observa-se degeneração e dilatação do espaço urinário com formação de cilindros hialinos difusos acentuado (setas azuis). Acentuado acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman, túbulos proximais e distais (demarcados em vermelho), com dilatação e vacuolização de túbulos proximais e espaço urinário (demarcados em preto). **A:** Aumento 100x. **B:** Aumento 200x.

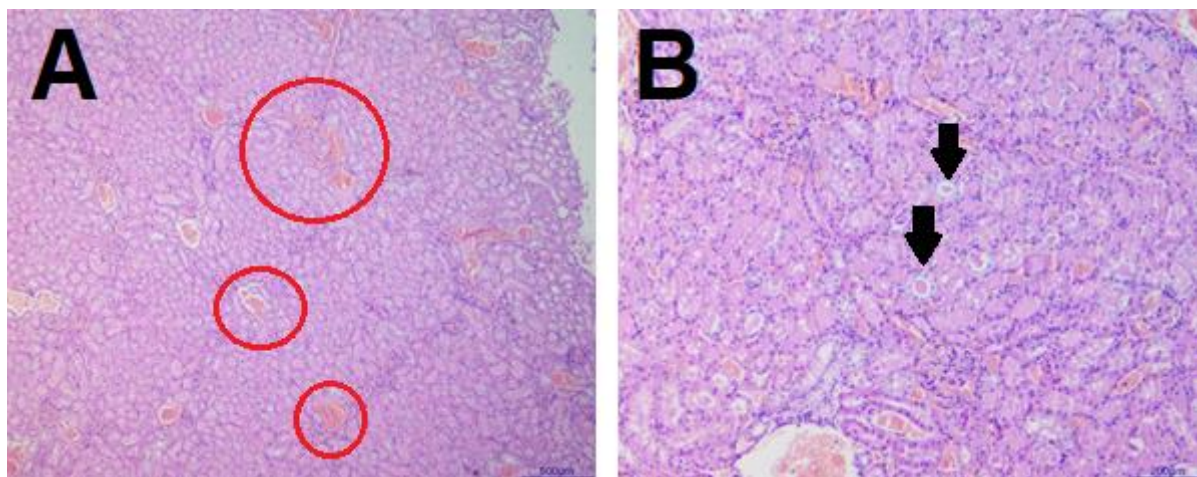


Figura 55. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 105 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 13), após coloração HE. Discreta degeneração de túbulos proximal e distal com formação de cilindros hialinos (setas pretas) e hiperemia multifocal acentuada (círculos vermelhos). **A:** aumento 40x. **B:** aumento 100x.

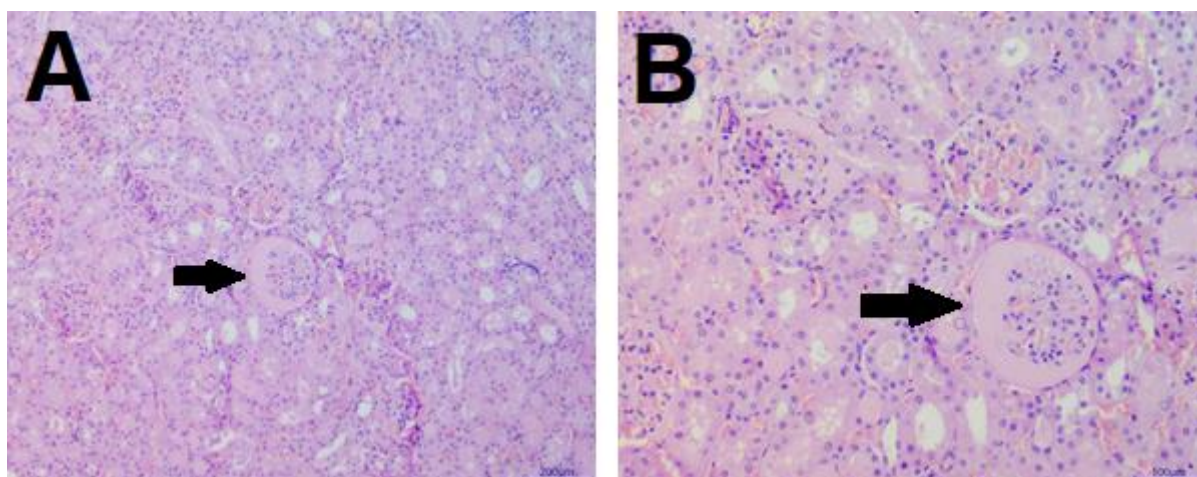


Figura 56. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 140 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 14), após coloração HE. Degeneração glomerular com acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman (setas) e túbulos proximais multifocal discreto. Hiperemia multifocal moderada. **A:** Aumento 100x. **B:** Aumento 200x.

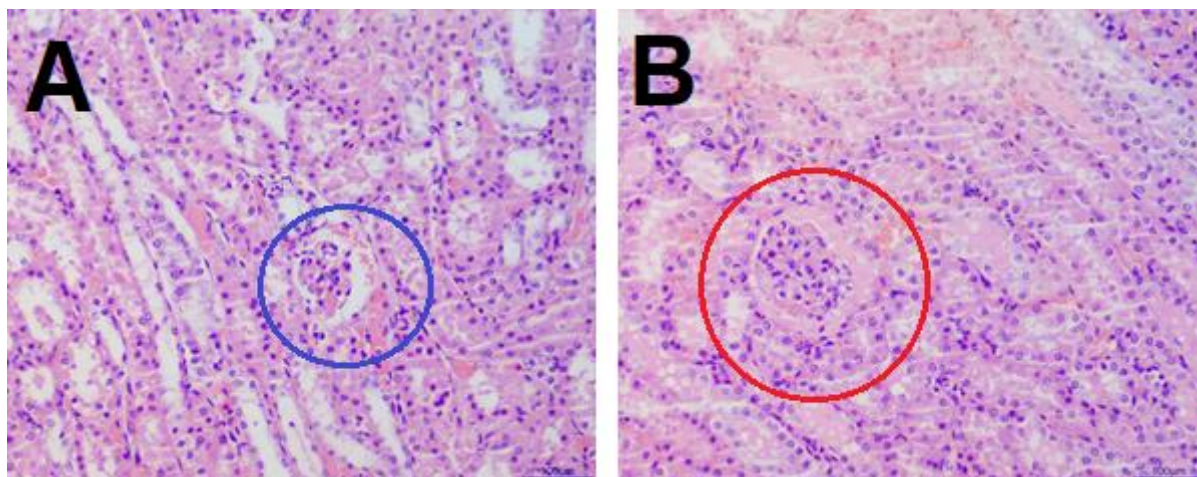


Figura 57. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 210 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. **A:** Aumento 200x. Hemorragia glomerular (destacado por círculo azul). **B:** Aumento 200x. Degeneração glomerular com acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman e túbulos proximais multifocal discreto (demarcado em vermelho).

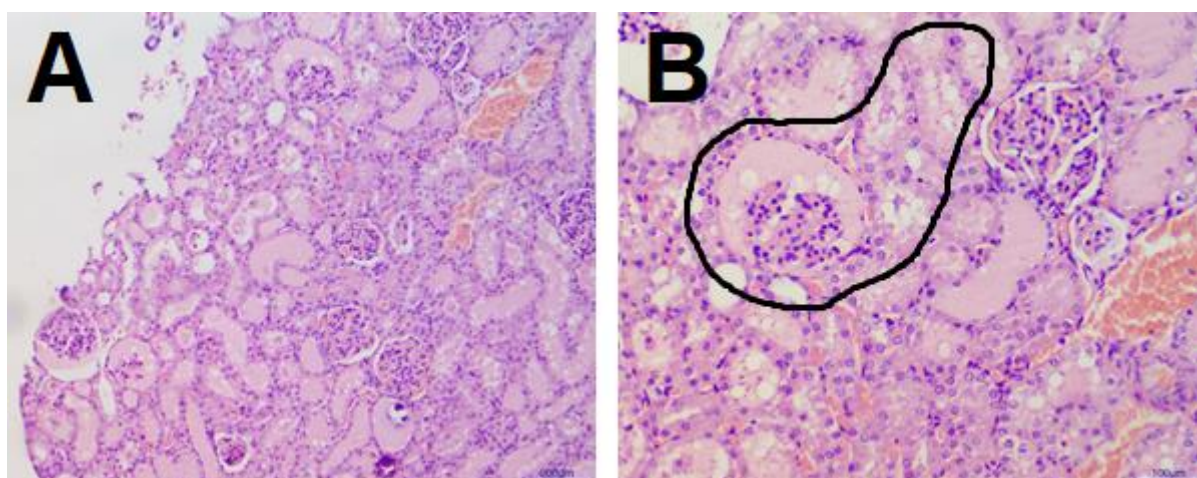


Figura 58. Fotomicroscopias de rim de cobaia inoculada com 350 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 16), após coloração HE. Degeneração glomerular com acúmulo de material amorfo eosinofílico em cápsula de Bowman e vacuolização de túbulos proximais multifocal discreto (demarcados em preto). **A:** aumento 100x. **B:** Aumento 200x.

Em estudos prévios, por meio da análise histológica dos rins de camundongos inoculados com diferentes doses do veneno de *L. intermedia*, foram demonstradas alterações histopatológicas similares. Nos néfrons, foi observada necrose tubular

aguda, acompanhada pela deposição de material hialino dentro dos túbulos proximais e distais, dilatação dos túbulos contorcidos proximais e hemorragia renal. As lesões puderam ser vistas cerca de 24 horas após a inoculação do veneno de *L. intermedia* (Tambourgi *et al.*, 1998b; Okamoto *et al.*, 2017). Em outro estudo dirigido por Luciano e colaboradores, nas biópsias renais de camundongos desafiados com veneno de *L. intermedia*, foi possível também identificar alterações como hialinização do espaço de Bowman, edema, colapso glomerular, presença de eritrócitos no espaço extracelular, degeneração vacuolar dos túbulos proximais e distais citotoxicidade de células epiteliais tubulares, deposição de material hialino no lúmen dos túbulos e alterações da membrana basal (Luciano *et al.*, 2004).

Os resultados encontrados na análise histopatológica dos rins corroboram com as alterações encontradas nas demais análises realizadas. A deposição de material hialino nos túbulos e, em alguns animais, também na cápsula de Bowman, demonstram a importante proteinúria notada nas urinálises e também nas eletroforeses realizadas por SDS-PAGE. Além disso, a ocorrência de lesões tubulares e glomerulares identificadas por meio da presença de proteínas de baixo e alto peso molecular na urina, respectivamente, são comprovadas, também, no exame de microscopia óptica. Alguns animais que apresentaram alterações histológicas, não tiveram alterações nos valores bioquímicos, o que se deve às limitações desses.

Apesar de considerados raros, existem relatos sobre a ocorrência de alterações histopatológicas cardíacas, cerebrais e hepáticas, além dos distúrbios renais, em vítimas de picadas de aranhas *Loxosceles* (GREMSKI *et al.*, 2022). Neste experimento, as lesões hepáticas foram notáveis no exame histopatológico. As alterações mais comuns encontradas foram: degeneração hepática multifocal moderada – diagnosticadas nos animais 6 (18,725 µg), 7 (21,533 µg), 14 (140 µg) e 15 (210 µg); e necrose de coagulação multifocal a coalescente acentuada com estruturas redondas, basofílicas, intralesionais – observadas nos animais 2 (12,789 µg), 5 (17,795 µg), 10 (29,995 µg) e 13 (105 µg). Além disso, na cobaia 8 (24,762 µg) verificou-se congestão hepática difusa acentuada e na cobaia 11 (47,985 µg), hepatite mediozonal focal discreta, com hiperemia difusa moderada. As alterações hepáticas observadas estão demonstradas nas figuras 59 a 68:

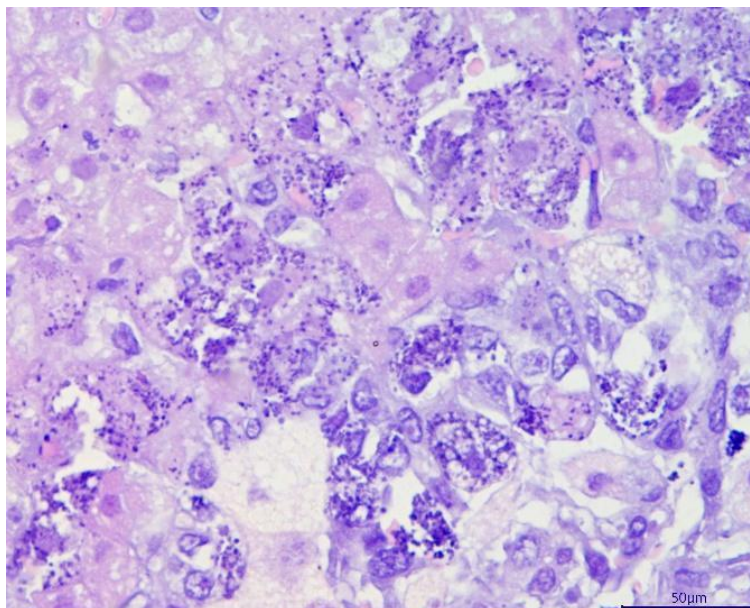


Figura 59. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 12,789 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 2), após coloração HE. Acentuada necrose de coagulação associada a dissociação e vacuolização de hepatócitos centrolobular, mediozonal e periportal, com presença de estruturas redondas, basofílicas, intralesionais e macrófagos hepáticos (células de Kupffer) intralesionais. Aumento 400x.

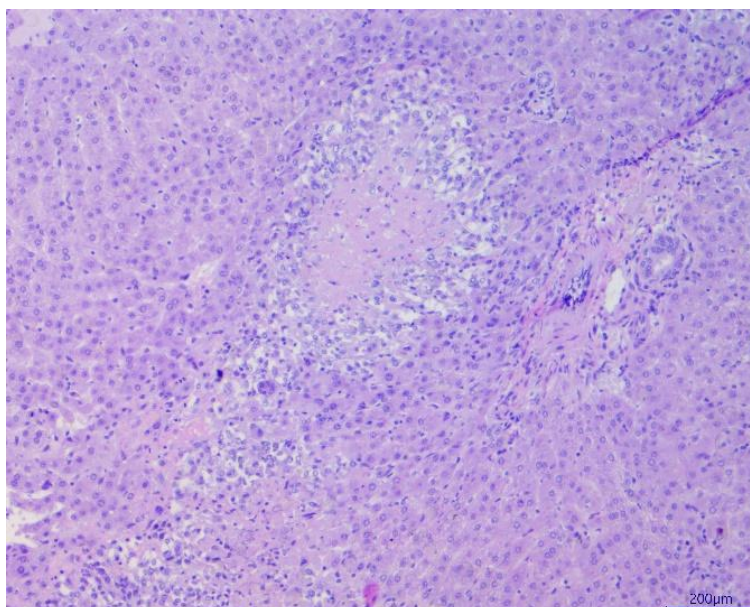


Figura 60. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 17,795 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 5), após coloração HE. Moderada necrose e degeneração multifocal associada à presença de estruturas basofílicas. Aumento 100x.

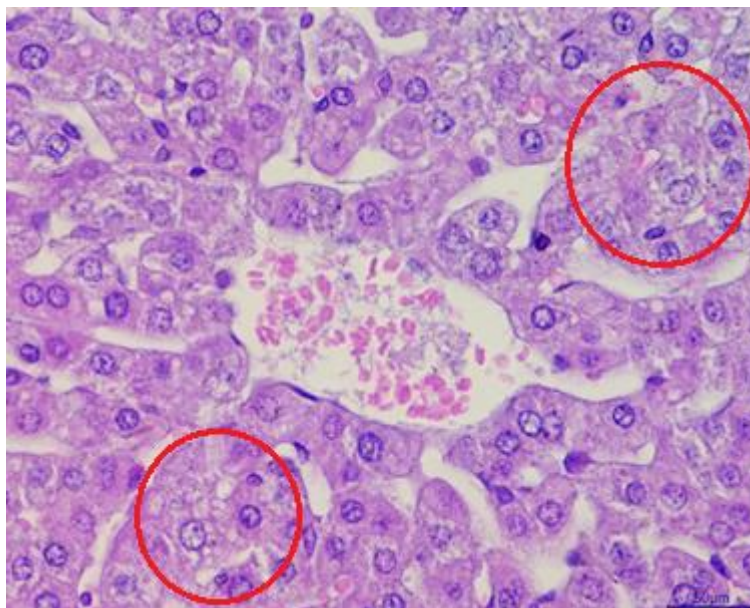


Figura 61. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 18,725 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 6), após coloração HE. Moderada degeneração por vacuolização hepática multifocal (destacada em vermelho). Aumento 400x.

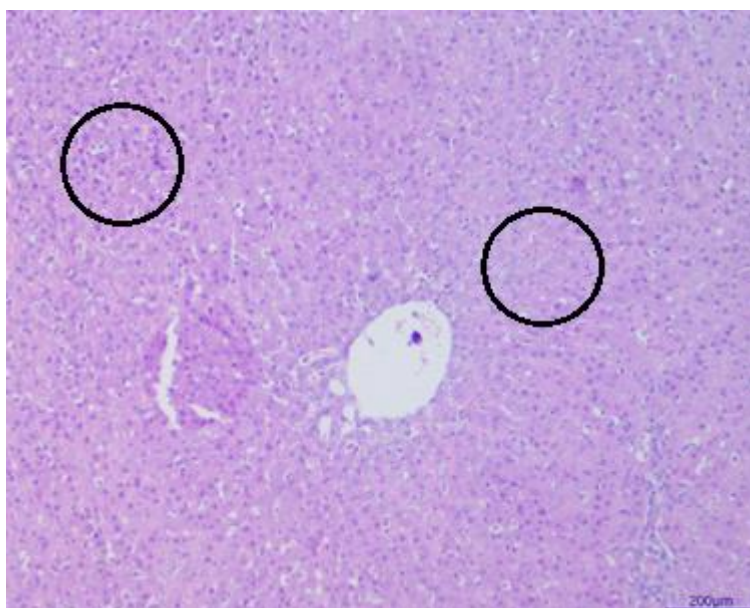


Figura 62. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 21,533 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 7), após coloração HE. Degeneração hepática multifocal moderada (circulada em preto). Aumento 100x.

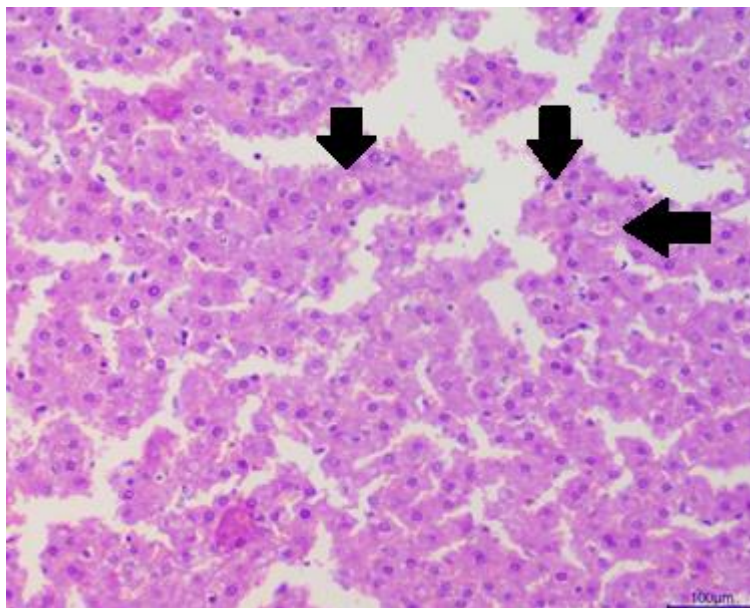


Figura 63. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 24,762 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE Congestão hepática difusa acentuada. Nota-se dilatação de capilares sinusoides em decorrência de acúmulo de hemácias intravascular (setas). Aumento 400x.

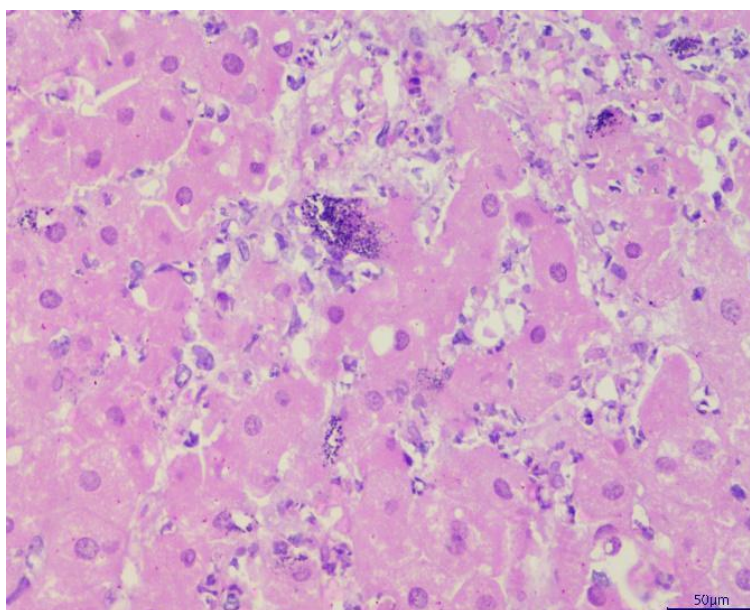


Figura 64. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 29,995 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 10), após coloração HE. Acentuada necrose de coagulação e degeneração hepática multifocal a coalescente associada a estruturas citoplasmáticas intralesionais (células de Kupfer). Aumento 400x.

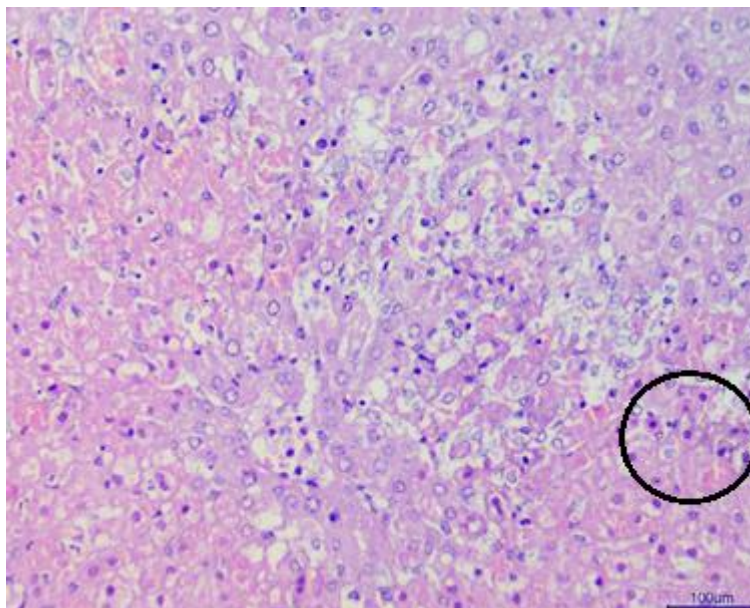


Figura 65. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 105 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 13), após coloração HE. Cobaia 13: Acentuada necrose de coagulação e degeneração hepática multifocal a coalescente acentuada associada a estruturas citoplasmáticas intralasionais intensamente basofílicas no citoplasma de hepatócitos e macrófagos hepáticos (células de Kupfer) (circuladas em preto). Aumento 200 x.

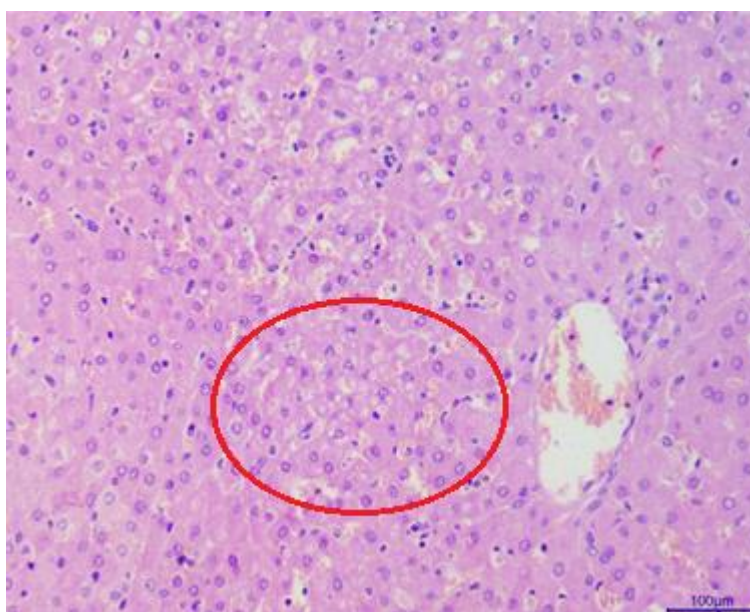


Figura 66. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 140 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 14), após coloração HE. Degeneração centrolobular multifocal discreta (destacada em vermelho). Aumento 200x.

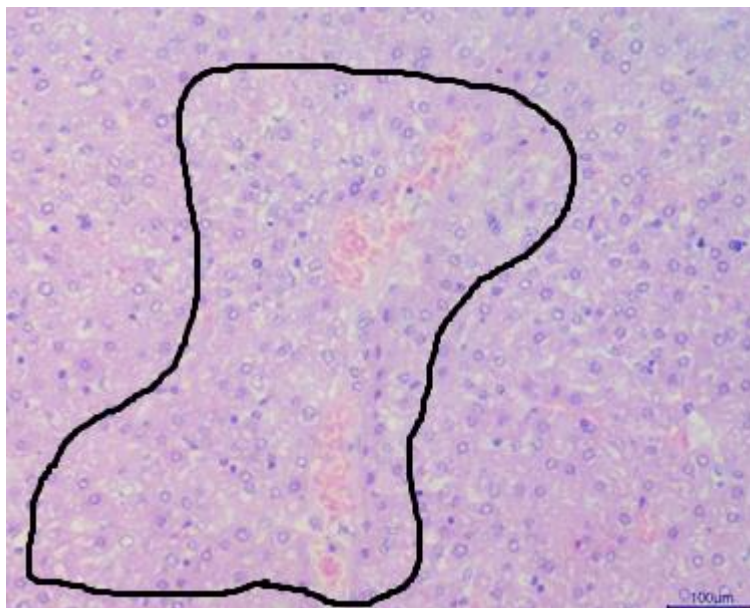


Figura 67. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 210 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. Degeneração centrolobular multifocal moderada (em preto). Aumento 200x.

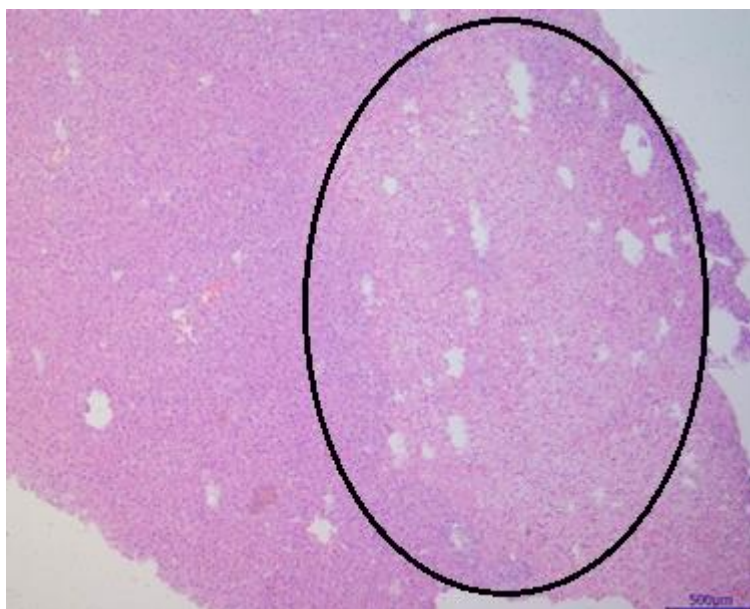


Figura 68. Fotomicroscopia hepática de cobaia inoculada com 350 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 16), após coloração HE. Necrose focal extensa (em preto) com estruturas basofílicas intralésionárias e degeneração centrolobular multifocal discreta. Aumento 40x.

Christoff *et al.* (2008), por meio de análises experimentais de ratos expostos ao veneno de *L. intermedia*, comprovaram alterações bioquímicas e histopatológicas do fígado desses animais, como aumento dos níveis séricos de lactato desidrogenase, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e gama-glutamil-transferase. Além disso, alterações histopatológicas indicativas de lesões hepáticas também foram descritas, como tumefação e apoptose de hepatócitos, infiltração leucocitária na região periportal e esteatose, cerca de 12 horas após o envenenamento. É importante pontuar que o fígado é um dos órgãos que mantêm as maiores concentrações de veneno após a exposição, segundo Dias-Lopes *et al.* (2010).

Duas cobaias apresentaram alterações cerebrais na análise histopatológica: os animais 3 (14,068 µg) e 7 (21,533 µg), com o desenvolvimento de lesões compatíveis à encefalite linfoplasmocitária e histiocística focal acentuada (Figura 69).

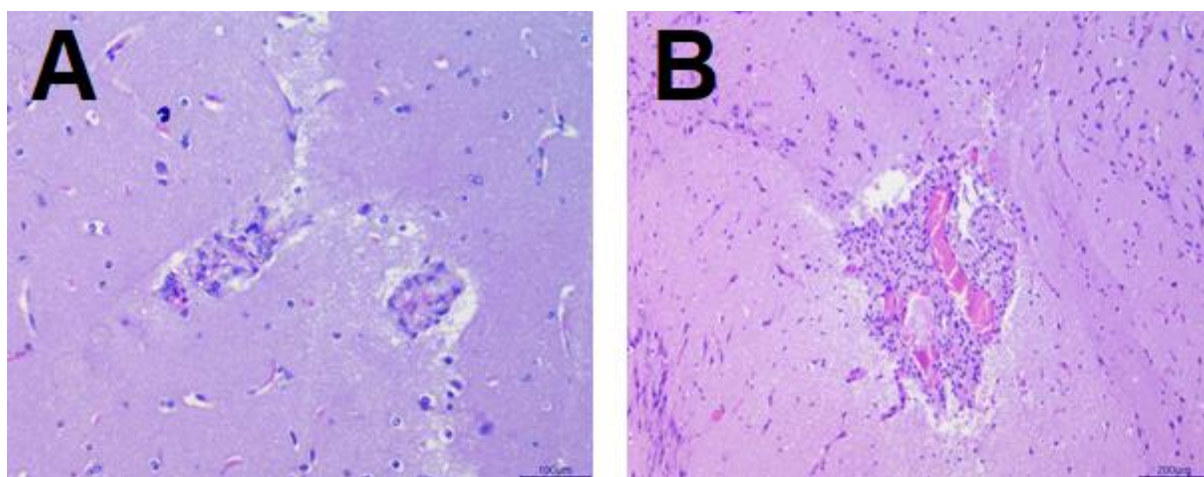


Figura 69. Fotomicroscopias de cérebro de cobaias inoculadas com 14,068 e 21,533 µg de veneno de *Loxosceles intermedia*, respectivamente, após coloração HE. Alterações histopatológicas cerebrais: **A:** Cobaia 3. Cérebro: Encefalite linfoplasmocitária e histiocítica focal discreta. Aumento 200x. **B:** Cobaia 7. Encefalite hemorrágica linfoplasmocitária e histiocítica multifocal moderada com gliose multifocal moderada.

Os registros sobre a ocorrência de distúrbios encefálicos causados pelo veneno de aranha-marrom são escassos. Em medicina humana, existem apenas dois relatos clínicos da ocorrência de neuropatias causadas por *Loxosceles* (PLENGE-TELLECHEA *et al.*, 2019). Em estudo realizado por Babcock *et al.* (1981), os quais utilizaram o camundongo como modelo experimental, demonstrou-se o aumento

sérico das frações 1 e 2 da CK, determinadas através de eletroforese, comprovando a susceptibilidade do sistema nervoso central nesse envenenamento. A elevação destes analitos, até então, eram considerados marcadores de trauma cerebral (HYDE e DRAISEY, 1974). Os mecanismos aos quais o veneno de aranha marrom provoca alterações cerebrais ainda não está totalmente elucidado, porém, é provável que não seja através de ação direta do veneno, uma vez que, Revelo *et al.* (2000), os quais utilizaram o ensaio de ELISA para detecção de veneno de *L. intermedia* em diferentes tecidos, não detectaram a presença de veneno no cérebro.

Embora parte das cobaias tenha apresentado anormalidades eletrocardiográficas e aumento dos níveis séricos de Troponina I, CK e CK-MB, apenas duas cobaias tiveram alterações cardíacas à análise histopatológica. O animal 8 (24,762 µg) apresentou congestão cardíaca difusa acentuada, e o animal 15 (210 µg), hemorragia focalmente extensa moderada no átrio esquerdo. A cobaia 8 apresentou somente alterações ao ECG, e a cobaia 15, devido ao seu precoce óbito, não possui outros exames para associação ao quadro histopatológico (Figuras 70 e 71).

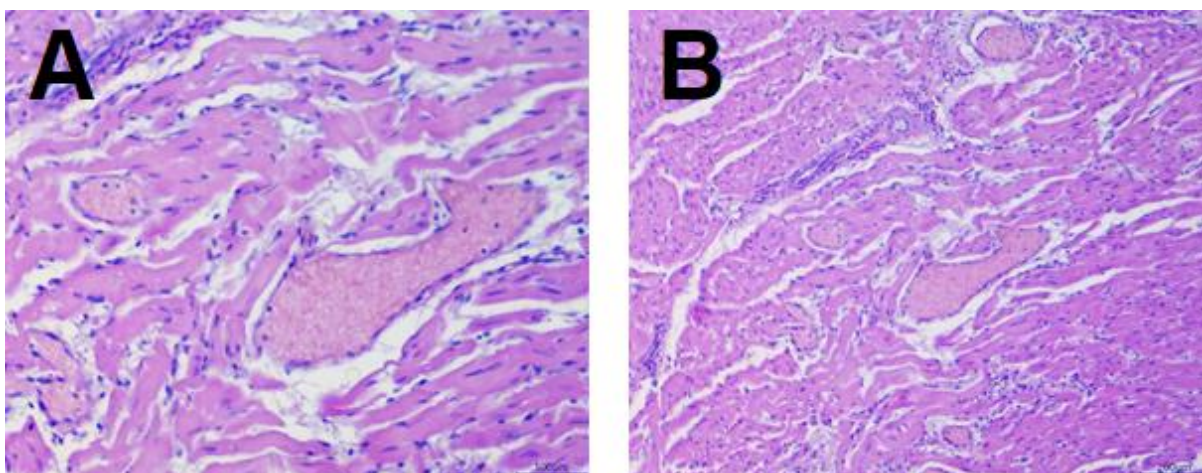


Figura 70. Fotomicroscopias cardíacas de cobaia inoculada com 24,762 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE. Nota-se congestão difusa acentuada. **A:** aumento 400x. **B:** Aumento 200x.

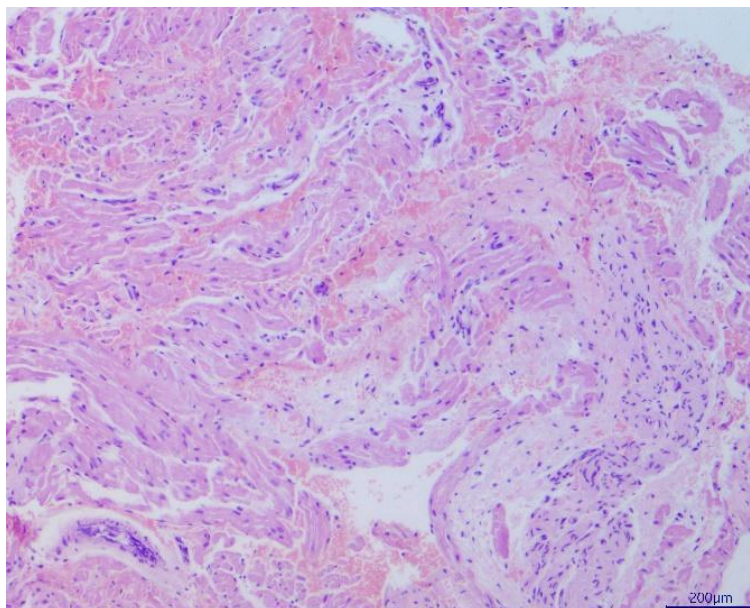


Figura 71. Fotomicroscopias cardíacas de cobaia inoculada com 210 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. Observa-se hemorragia focalmente extensa moderada em átrio esquerdo.

A atividade cardiotoxica do veneno loxoscélico é comprovada por achados laboratoriais de animais expostos tanto ao veneno, quanto às toxinas purificadas. Em estudos experimentais utilizando ratos, foi demonstrado que ambos tinham potencial cardiotoxico, levando a alterações teciduais no coração dos animais tratados (DIAS-LOPES *et al.*, 2010).

As lesões dermatohistopatológicas assumem grande importância na avaliação do loxoscelismo, uma vez que a ocorrência de lesões dermonecroticas com disseminação gravitacional e infiltração histológica maciça de neutrófilos são consideradas sua principal característica, fazendo com que o loxoscelismo seja frequentemente referido como araneísmo necrótico ou gangrenoso. Nas cobaias avaliadas neste experimento, através da microscopia óptica, foi possível observar alterações na pele de todos os animais que foram expostos à aplicação do veneno de *L. intermedia*, mesmo naqueles que não apresentaram alterações dermatológicas macroscópicas. É importante salientar que os achados histopatológicos dependem do tempo de coleta após a exposição ao veneno e também à dosagem de veneno aplicada (MELO *et al.*, 2014), portanto, devido ao óbito precoce de alguns dos animais deste experimento, as alterações histopatológicas encontradas variaram entre as cobaias. As alterações podem ser observadas nas figuras 72 a 88.

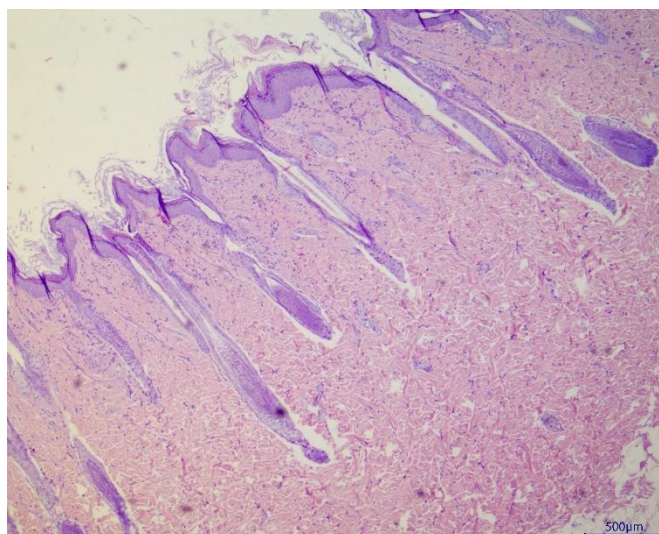


Figura 72. Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com solução fisiológica 0,9% (controle), após coloração HE. Não há ocorrência de lesão aparente. Aumento 40x.

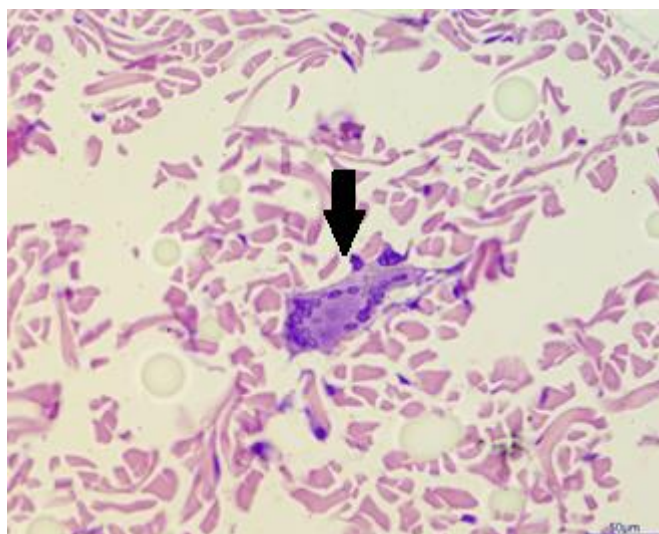


Figura 73. Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 11,627 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 1), após coloração HE. Nota-se a ocorrência de dermatite granulomatosa multifocal discreta. Presença de células gigantes multinucleadas em derme profunda (seta). Aumento 400x.

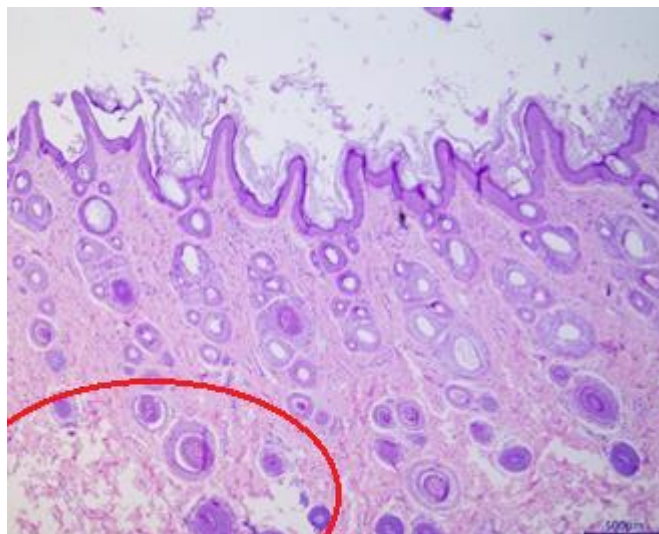


Figura 74. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 12,789 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 2), após coloração HE. Nota-se edema focalmente extenso acentuado (em vermelho). Aumento 40x.

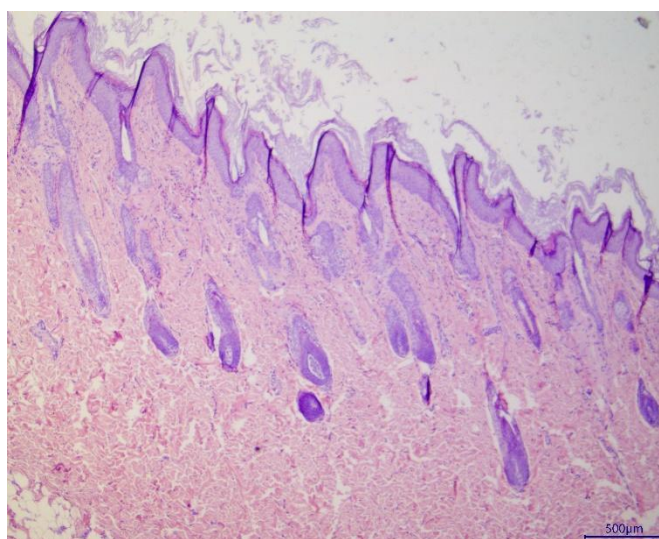


Figura 75. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 14,068 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 3), após coloração HE. Não foram observadas lesões aparentes. Aumento 40x.

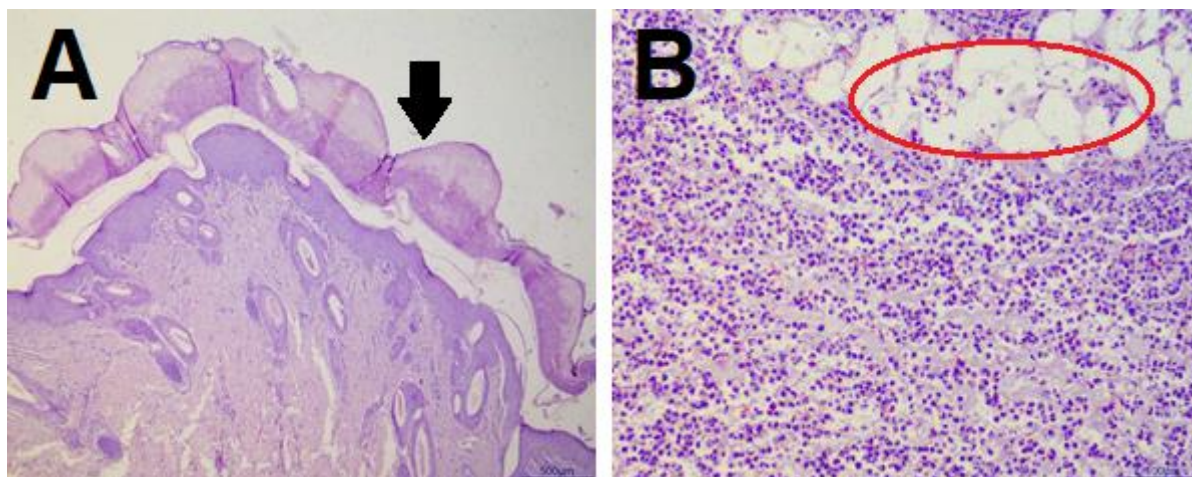


Figura 76. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 15,475 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 4), após coloração HE. **A:** Nota-se epidermite neutrofílica focalmente extensa acentuada (seta), com dissociação da camada córnea focalmente extensa acentuada com restos celulares, aparentemente neutrófilos, no interior da camada córnea. Perda de estriações e hipereosinofilia multifocal discreta em leiomiócitos. Aumento 40x. **B:** Paniculite necrotizante neutrofílica difusa acentuada. Camada adiposa com infiltrado inflamatório neutrofílico difuso acentuado (em vermelho) associado a edema e necrose multifocal moderado. Aumento 200x.

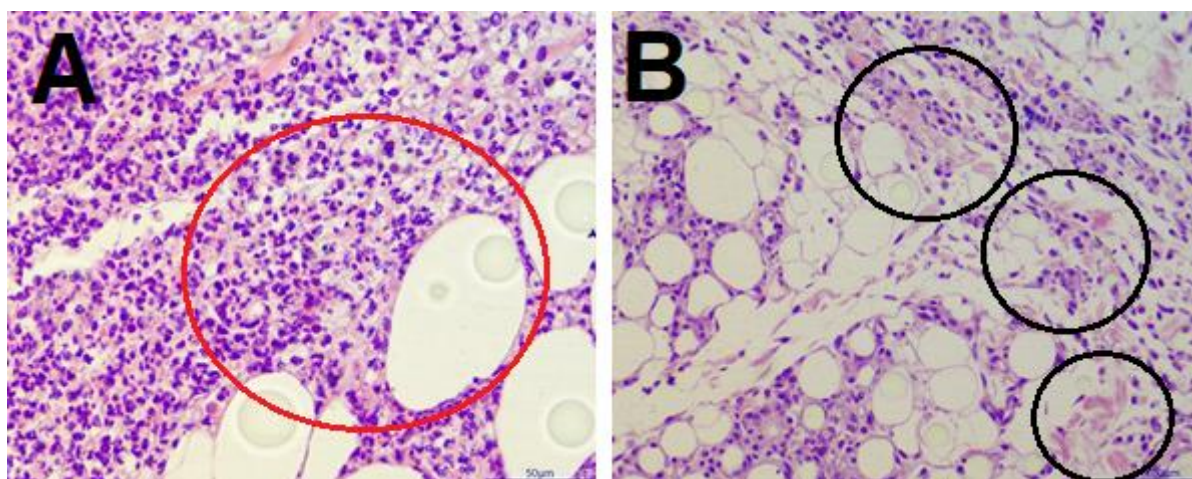


Figura 77. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 17,795 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 5), após coloração HE. Observa-se a ocorrência de paniculite neutrofílica focal acentuada. **A:** Infiltrado inflamatório neutrofílico focal acentuado, com infiltrado neutrofílico e histiocitário difuso discreto (em vermelho). Aumento 600x. **B:** Hemorragia multifocal discreta (em preto). Aumento 200x.

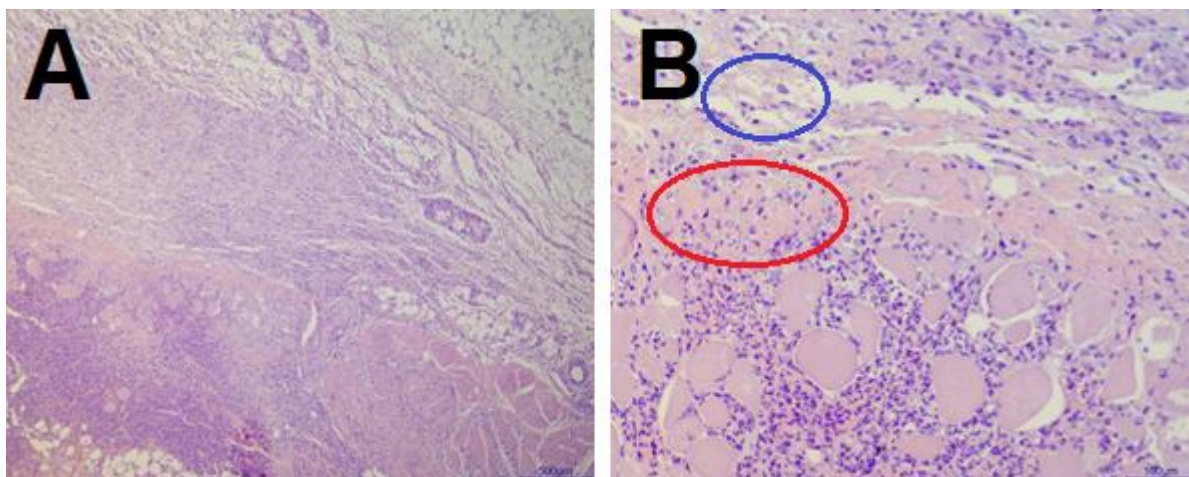


Figura 78. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 18,725 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 6), após coloração HE. Observa-se dermatite neutrofílica focalmente extensa acentuada. **A:** Infiltrado inflamatório neutrofílico focalmente extenso acentuado em derme superficial, até derme profunda, associado a degeneração de leiomiócitos multifocal acentuada. **B:** Porção adjacente de panículo apresentando material amorfo (edema) (em vermelho) e fibrilar (fibrina) (em azul) eosinofílico.

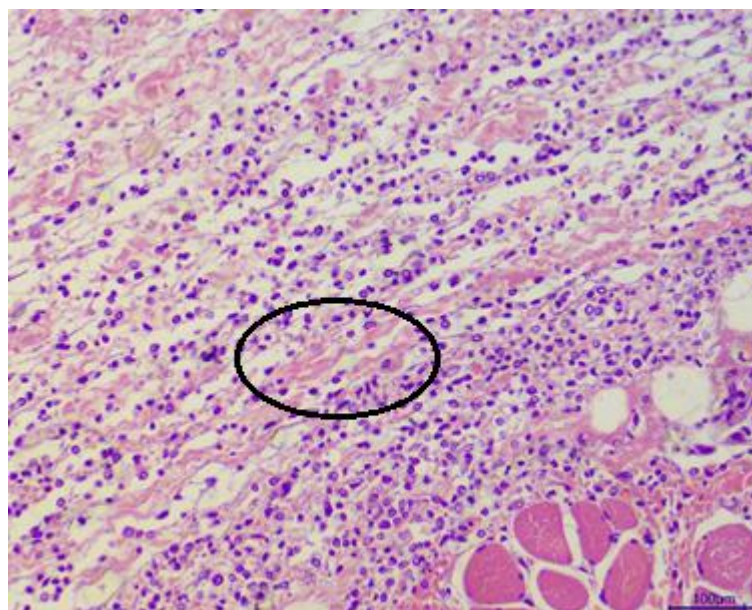


Figura 79. Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 21,533 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 7), após coloração HE. Nota-se a ocorrência de paniculite fibrinosa linfohistioplasmocitária e neutrofílica multifocal a coalescente moderada. Observa-se infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário e neutrofílico multifocal a coalescente moderado associado a fibrina (circulado) e hemorragia difusa moderada.

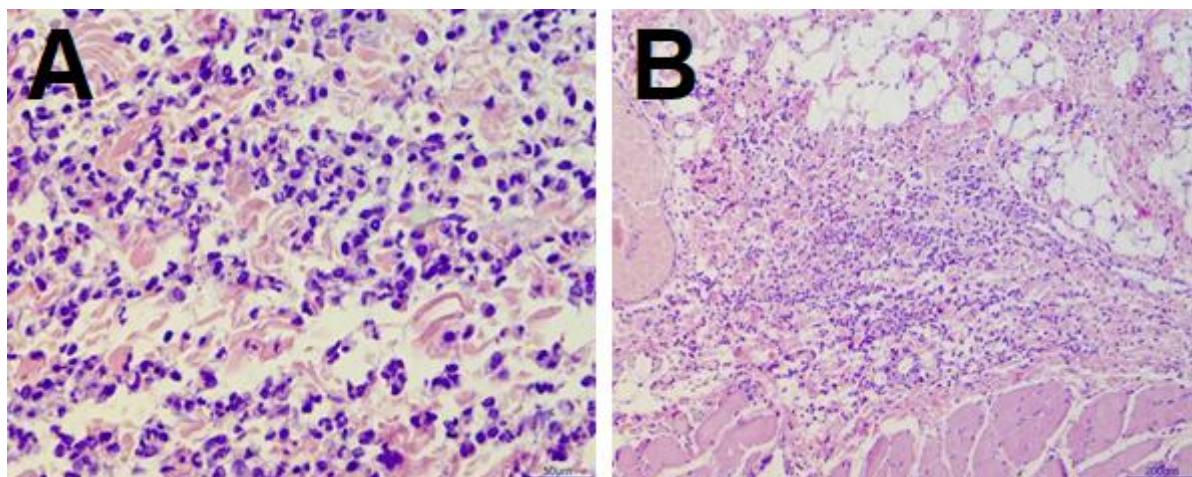


Figura 80. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 24,762 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 8), após coloração HE. **A:** Dermatite neutrofílica focalmente extensa moderada. Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico focalmente extenso moderado em derme profunda. Camada adiposa com infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitária mínimo. Aumento 400x. **B:** Paniculite neutrofílica e histiocitária focal discreta. Nota-se infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitário perivascular focal discreto associado à hemorragia e edema focal discreto. Aumento 200x.

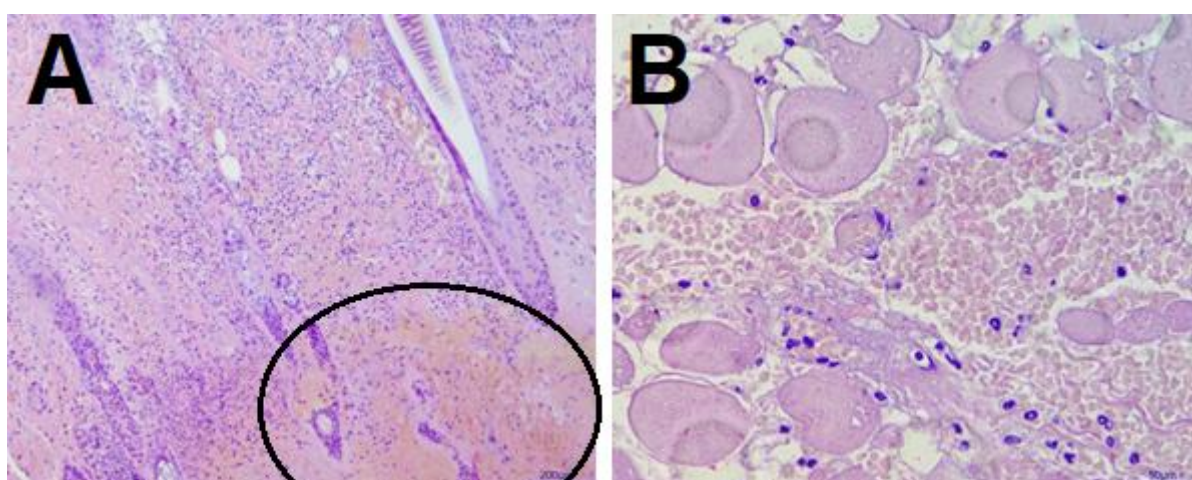


Figura 81. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 28,477 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 9), após coloração HE. **A:** Dermatite hemorrágica neutrofílica multifocal a coalescente acentuada (em preto). Nota-se hemorragia multifocal a coalescente acentuada, associada a necrose e dissociação de fibras colágenas multifocal acentuado e infiltrado inflamatório neutrofílico nas bordas da área hemorrágica, moderado, predominantemente em derme superficial e epiderme. Aumento 40x. **B:** Dermatite profunda neutrofílica e histiocítica multifocal discreta. Há infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitário multifocal discreto. Aumento 200x.

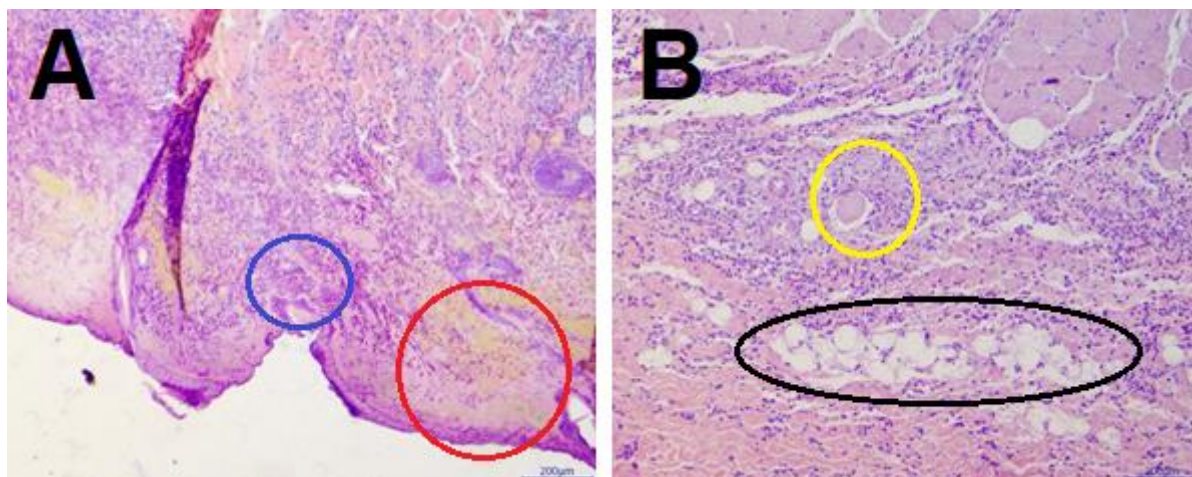


Figura 82. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 29,995 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 10), após coloração HE. **A:** Epidermite necrohemorrágica (em vermelho) neutrofílica (em azul) focalmente extensa acentuada. Observa-se necrose e hemorragia focalmente extensa associada a infiltrado inflamatório neutrofílico acentuados, extendendo-se até a camada superficial de derme. Aumento 100x. **B:** Dermatite e paniculite neutrofílica multifocal moderada (em preto) com trombo e degeneração de leiomiócitos multifocal moderada. Infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal a coalescente moderado com formação de trombos multifocais (em amarelo) e degeneração de leiomiócitos multifocal moderada. Aumento 100x.

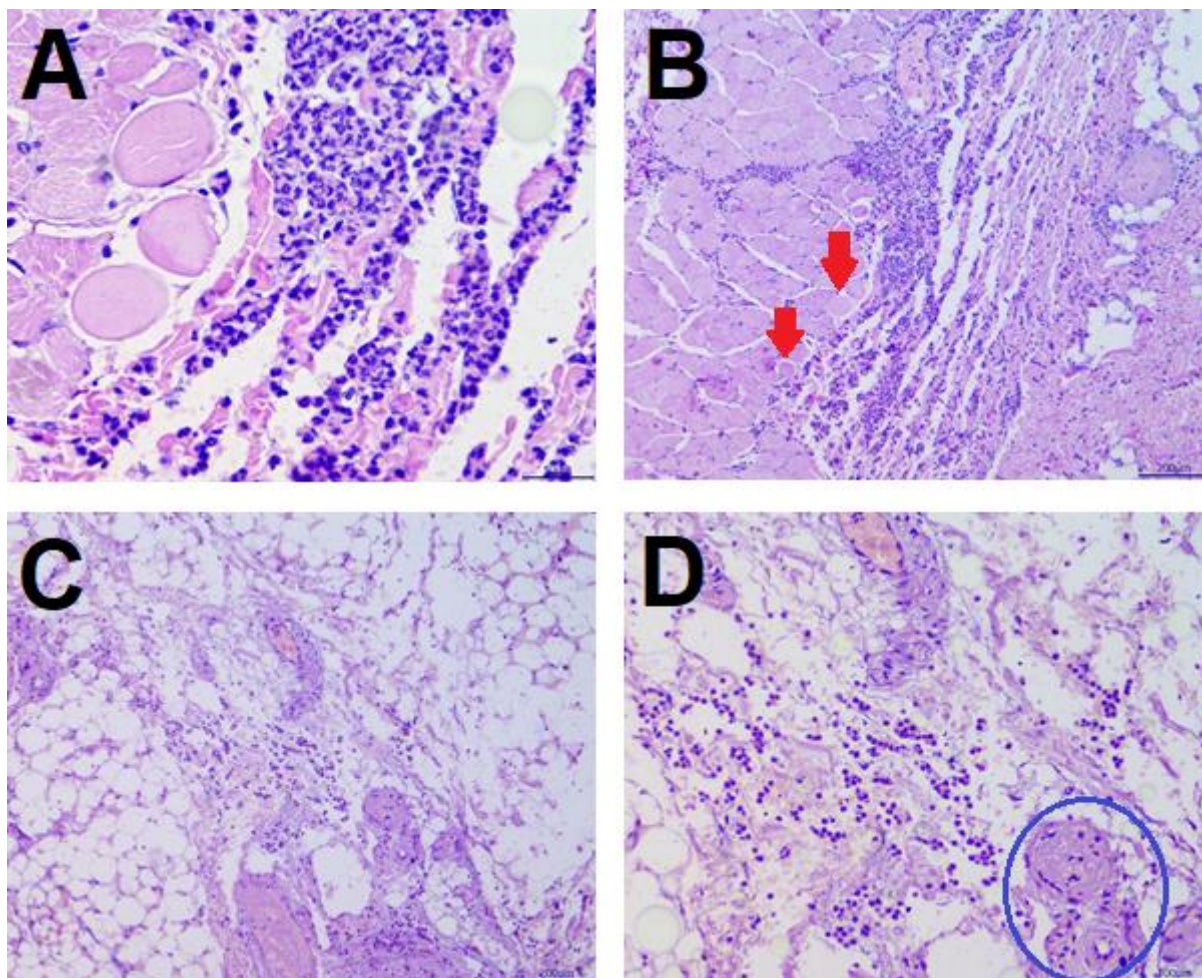


Figura 83. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 47,985 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 11), após coloração HE. **A:** Dermatite necrotizante neutrofílica focalmente extensa acentuada, observa-se necrose focalmente extensa, da epiderme até a derme superficial, associada a hemorragia multifocal acentuada e infiltrado inflamatório neutrofílico. Aumento 400x. **B:** Dermatite neutrofílica focalmente extensiva, com degeneração de leiomiócitos e paniculite hemorrágica neutrofílica focalmente extensa acentuada e eventuais trombos. Presença de infiltrado inflamatório neutrofílico focalmente extenso acentuado, que por vezes permeia a camada muscular. Camada muscular apresentando perda de estriação e hipereosinofilia multifocal discreta de leiomiócitos (em vermelho). Aumento 200x. **C:** Camada adiposa apresentando hemorragia focalmente extensa acentuada, infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal a coalescente moderado, hiperemia multifocal moderada, e eventuais trombos. Aumento 200x. **D:** Perivasculite neutrofílica focal discreta (em azul). Nota-se infiltrado inflamatório neutrofílico focal discreto perivascular em derme. Aumento 400x.

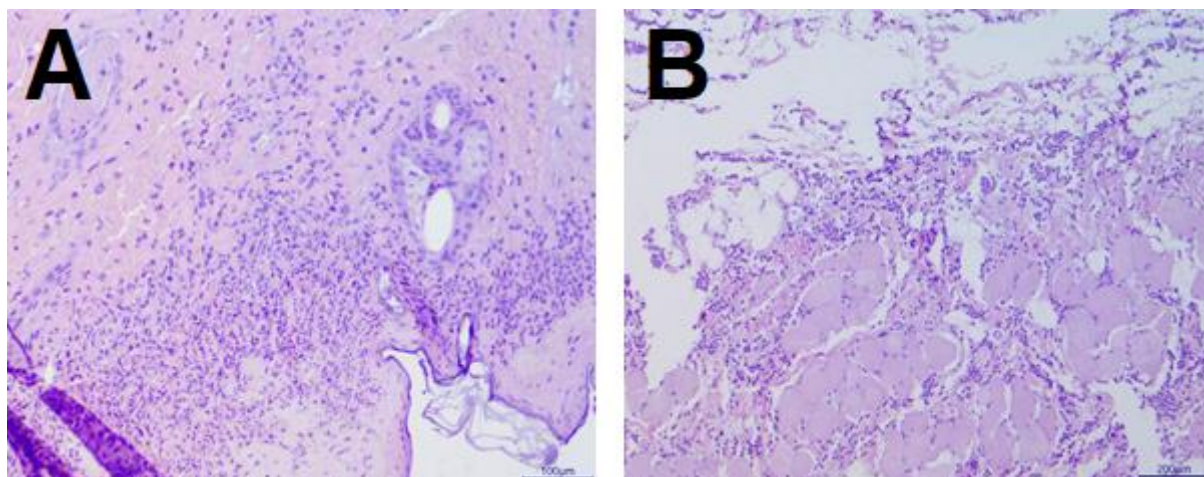


Figura 84. Fotomicroscopias de pele de cobaia inoculada com 76,775 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 12), após coloração HE. **A:** Dermatite necrotizante neutrofílica focalmente extensa acentuada Aumento 100x. **B:** Paniculite e perivascularite linfohistioplasmocitária e neutrofílica multifocal moderada com formação de trombo multifocal discreta. Observa-se necrose focalmente extensa e profunda, da epiderme até a derme profunda, com hemorragia. Na derme mais profunda, limítrofe ao tecido adiposo há infiltrado inflamatório linfoplasmocitário difuso moderado, que por vezes se estende à camada adiposa. Na camada adiposa, hemorragia multifocal moderada e congestão multifocal moderada, com infiltrado inflamatório perivascular linfoplasmocitário e neutrofílico multifocal discreto, associado à formação de trombo multifocal discreto. Aumento 200 x.

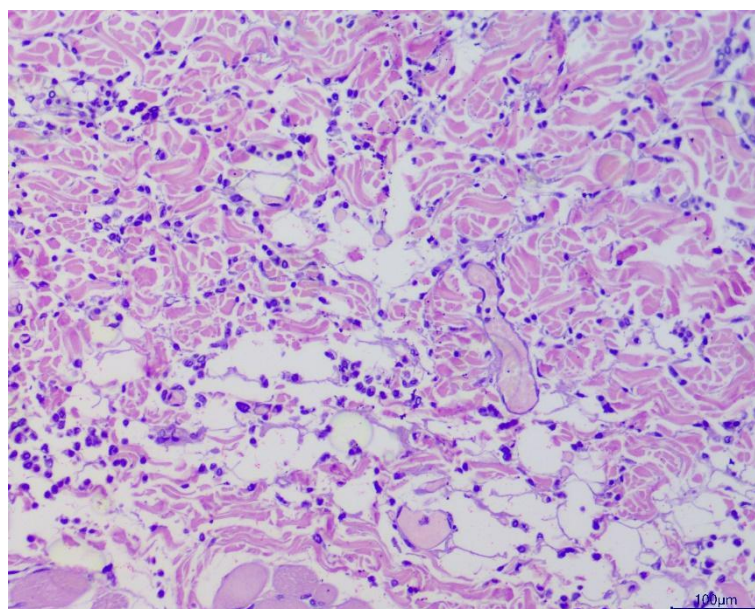


Figura 85. Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 105 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 13), após coloração HE. Dermatite linfoplasmocitária e neutrofílica profunda difusa discreta. Nota-se infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico profundo difuso discreto, predominantemente perivascular. Aumento 100x.

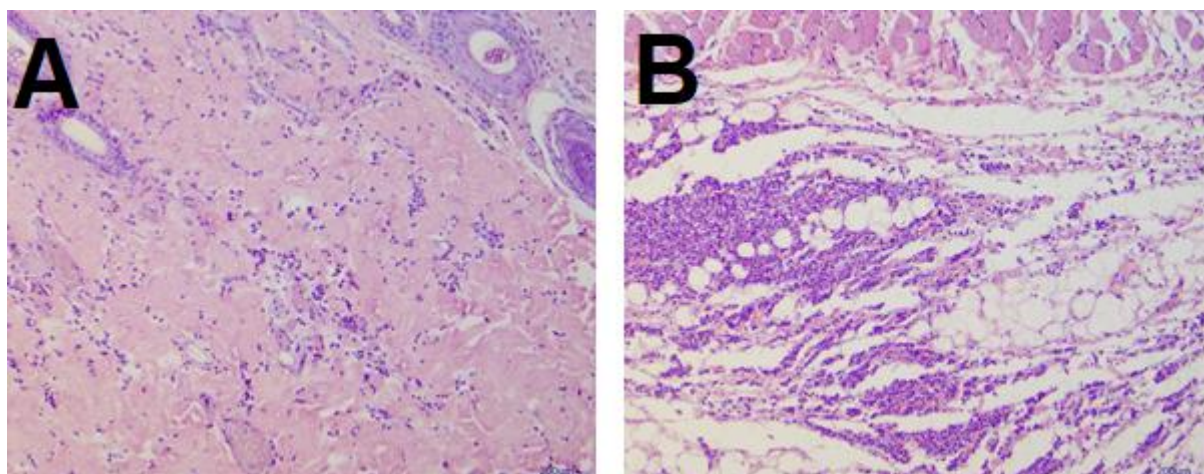


Figura 86. Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 140 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 14), após coloração HE. **A:** Dermatite neutrofílica multifocal discreta. Infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal discreto. Aumento 200 x; **B:** Paniculite fibrinohemorrágica neutrofílica multifocal acentuada. Aumento 200x.

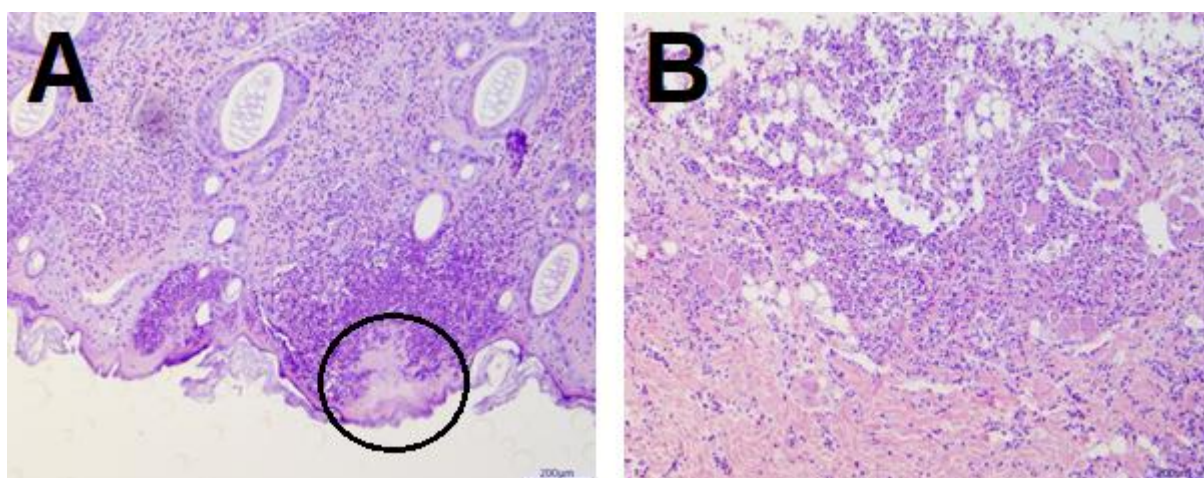


Figura 87. Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 210 μg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 15), após coloração HE. Observa-se epidermite necrotizante neutrofílica focal acentuada com dermatite e paniculite neutrofílica multifocal acentuada. **A:** Necrose focal da epiderme (destacada em preto), associada a infiltrado inflamatório neutrofílico focal acentuado, com formação de microabscessos intraepidermais. Aumento 200x. **B:** O mesmo infiltrado se estende até derme profunda, alcançando camada adiposa. Aumento 200x.

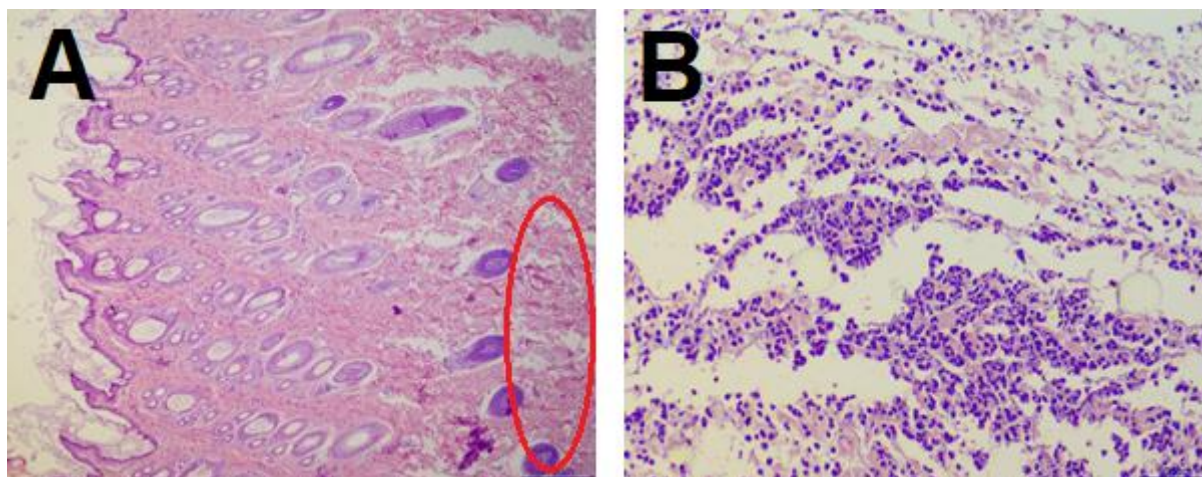


Figura 88. Fotomicroscopia de pele de cobaia inoculada com 350 µg de veneno de *Loxosceles intermedia* (animal 16), após coloração HE. **A:** Dermatite fibrino-hemorrágica profunda linfoplasmocitária e neutrofílica focalmente extensa moderada (em vermelho). Aumento 40x. **B:** Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico profundo focalmente extenso em derme profunda, início de panículo, moderado, associada a hemorragia e fibrina multifocal moderadas. Aumento 200x.

As toxinas dermonecroticas do veneno loxoscélico estão associadas a um grande número de alterações histopatológicas, seja através de acidentes envolvendo as aranhas do gênero, ou em envenenamentos experimentais (OSPEDAL *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2004; HOGAN *et al.*, 2004; SWANSON e VETTER, 2006). Geralmente, observam-se edema, formação de trombos e áreas hemorrágicas iniciais, seguidos por infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico e necrose de coagulação na epiderme e na derme (MELO *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2022). A principal alteração observada no tecido após exposição ao veneno é a infiltração massiva de células inflamatórias, denominadas de polimorfonucleados na pele e a geração de mediadores pró-inflamatórios próximos ao local da picada ou injeção de toxina, o que é apontado como o principal contribuinte ao dano tecidual (OSPEDAL *et al.*, 2002; DOMINGOS *et al.*, 2003; TAMBOURGI *et al.*, 2005; BARBARO *et al.*, 2010).

Segundo Tavares *et al.* (2004), a análise histopatológica da pele de coelhos, 24 horas após a administração do veneno de *Loxosceles gaucho*, demonstra a presença maciça de leucócitos e plaquetas, hemorragia e formação de trombos no local de inoculação do veneno. Neste experimento, nas cobaias que receberam concentrações acima de 21,533 µg (animais 7 a 16), que vieram a óbito cerca de 24 horas após o envenenamento, alterações similares foram vistas. Em todas, a infiltração neutrofílica/polimorfonuclear pôde ser apontada, bem como de outras

células inflamatórias, como histiócitos e células linfoplasmocitárias. Áreas hemorrágicas também foram encontradas nestes animais, com exceção dos animais 8 (24, 762 µg), 13 (105 µg) e 15 (210 µg). A formação de trombos foi observada nos animais 9 (28,477 µg), 10 (29,995 µg), 11 (47,985 µg) e 12 (76,775 µg). Além disso, foram verificadas a ocorrência de áreas de necrose nos animais 8 (24, 762 µg), 10 (29,995 µg), 11 (47,985 µg), 12 (76,775 µg) e 15 (210 µg); degeneração de leiomíocitos nos animais 8 (24, 762 µg), 10 (24, 762 µg) e 11 (47,985 µg), e, edema nos animais 8 (24, 762 µg) e 9 (28,477 µg).

Nos animais que foram eutanasiados após 72 horas, que receberam concentrações menores ou iguais à 18,725 µg, a variação da gravidade da lesão se torna mais evidente. Nos animais 1 (11,627 µg), 2 (12,789 µg) e 3 (14,068 µg), sequer houve ocorrência do marcante infiltrado neutrofílico, sendo observadas, respectivamente, dermatite granulomatosa, edema e, no último, nenhuma alteração histopatológica.

A Dose Mínima Necrosante (DMN) do veneno de *L. intermedia* em cobaias, ou seja, a menor quantidade de veneno capaz de provocar uma lesão dermonecrotica sem causar o óbito do animal ainda não foi descrita. Alterações marcantes passam a ser notadas a partir da concentração de veneno inoculada no animal 4 (15,475 µg), com a presença de infiltrações neutrofílicas e áreas de necrose, o que pode sugerir que a DMN do veneno de *L. intermedia* em cobaias, esteja próxima dessa concentração. Nos animais que receberam doses acima de 15,475 µg, já são observadas alterações semelhantes às encontradas nos coelhos e, nas cobaias que receberam doses maiores. Os resultados similares aos encontrados em coelhos, destacam a cobaia, também, como um excelente modelo experimental do loxoscelismo, uma vez que, segundo Isbister e Fan (2011), as lesões cutâneas encontradas em coelhos se assemelham muito às lesões descritas no loxoscelismo em humanos.

7. Conclusões

O veneno de *Loxosceles intermedia* foi capaz de causar um quadro sistêmico grave em cobaias. Os sinais clínicos foram observados em diferentes concentrações de veneno. Clinicamente, os animais apresentaram prostração, mudança de comportamento e de postura, letargia, diminuição da ingestão de alimentos e diarreia, que foram visualizados com concentrações acima de 21,533 µg de veneno. Menores concentrações de veneno de *L. intermedia*, entre 11,627 e 18,727 µg são capazes de causar alterações locais de pouca gravidade, como eritema local, prurido, edema, halo hemorrágico e dor local. Todavia, maiores concentrações, acima de 105 µg de veneno de *L. intermedia*, causaram discretas alterações locais, mas, com rápida ocorrência de óbito.

Todos os animais desafiados com veneno de *L. intermedia*, com concentrações entre 11,627 a 350 µg, apresentaram alterações no perfil urinário, com intensa proteinúria, demonstrada por meio de urinálise e análise eletroforética da urina. Esses resultados, comprovaram que o envenenamento loxoscélico é capaz de causar lesão renal (tubular e glomerular) em cobaias, mesmo em doses baixas. Como reflexo, no perfil bioquímico de alguns desses animais, houve um aumento sérico de biomarcadores renais, tais como creatinina, ureia, fósforo e SDMA.

Em animais desafiados com concentrações acima de 21,535 µg veneno de *L. intermedia*, além de sinais clínicos, foram observadas alterações no perfil hematológico, como a presença de policitemia relativa, leucocitose com inversão da proporção neutrófilos e linfócitos e, trombocitopenia.

Outro importante efeito do veneno recai sobre sua cardiotoxicidade. No eletrocardiograma das cobaias desafiadas com veneno de *L. intermedia* (doses entre 11,627 e 47,987 µg) ocorreram várias alterações no traçado, tais como batimentos cardíacos sinusais e juncionais, extrassístole atrial, dissociação átrio-ventricular e episódios de taquicardia atrial. Além disso, nos exames séricos, houve aumento de Troponina I, CK-MB e LDH.

O exame histopatológico revelou alterações em diferentes órgãos. As alterações renais e dermatológicas foram mais frequentes e proeminentes. Nos rins, a hialinização e degeneração de túbulos distais, proximais e glomérulos foram as principais alterações observadas. Na pele, a infiltração neutrofílica característica do

envenenamento loxoscélico teve destaque. Em acréscimo, alguns animais apresentaram também alterações hepáticas e cardíacas. E, também grave, foi a presença alterações cerebrais nos animais 3 (14,068 µg) e 7 (21,533 µg), com o desenvolvimento de lesões compatíveis à encefalite linfoplasmocitária e histiocística focal acentuada, descritas pela primeira vez nessa pesquisa.

Dessa forma, é possível concluir que, as cobaias (*Cavia porcellus*) são um ótimo modelo experimental do loxoscelismo, com destaque para a manifestação da forma sistêmica, uma vez que, baixas concentrações do veneno já são capazes de causar alterações que mimetizam o quadro sistêmico observado em seres humanos e em outros animais, como os cães, por exemplo.

7. Referências Bibliográficas

ADAMS, R.D.; J.E.; BODOR, G.S.; DAVILA-ROMAN, V.G.; DELMEZ, J.A., APPLE, F. S., LADENSON, J.H., & JAFFE, A.S. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. **Circulation**, v. 88, n. 1, p. 101-106, 1993.

ANDRADE, S.A.; MURAKAMI, M.T.; CAVALCANTE, D.P. et al. Kinetic and mechanistic characterization of the sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 47, p. 380-386, 2005.

APPEL, M.H.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, v.2, p.152-158, 2005

BABCOCK, J.L.; SUBER, R.L.; FRITH, C.H.; GEREN, C.R. Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v. 19, n. 4, p. 463-471, 1981.

BACHMAIER, K.; MAIR, J.; OFFNER, F.; PUMMERER, C. & NEU, N. Serum cardiac troponin T and creatine kinase–MB elevations in murine autoimmune myocarditis. **Circulation**, v. 92, n. 7, p. 1927-1932, 1995.

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C. Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Brasil, pp. 160–174, 2003.

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D. et al. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30, p. 331-338, 1992.

BARBARO, K.C.; LIRA, M.S.; ARAUJO, C.A. et al. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 56, p. 972-979, 2010

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

BARRETTO, O.C.D.O.; SOEIRO, P.K.; FIGUEIREDO, F.L.K.; ACHUCARRO, S.P.A. Functional alterations of rabbit erythrocytes induced by *Loxosceles gaucho* venom. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, n. 10, p: 817-821, 2007.

BARROS, R.T.; ALVES, M.A.R.; DANTAS, M.; KIRSZTAJN, G.M.; SENS, Y.A.S. Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento. São Paulo: Savier. p. 457. 2006.

BASTOS, M.G.; BASTOS, R.M.R.; PAULA, R.B. Avaliação da função renal. **Nefrologia no consultório**. Artmed, pp. 49-67, 2007.

BERNSTEIN, B.; EHRLICH, F. Brown recluse spider bites. **Journal of Emergency Medicine**, v. 4, n. 6, p. 457-462, 1986.

BERS, D.M.; GUO, T.A.O. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1047, n. 1, p. 86-98, 2005.

BEY, T.A.; WALTER, F.G.; LOBER, W., SCHMIDT, J.; SPARK, R.; SCHLIEVERT, P.M. *Loxosceles arizonica* bite associated with shock. **Annals of Emergency Medicine**, v. 30, p.701–703, 1997.

BILBROUGH, G.; EVERT, B.; HATHAWAY, K.; PANAGAKOS, G.; ROBERTSON, J.; YERRAMILLI, M. IDEXX Catalyst SDMA Test for in-house measurement of SDMA concentration in serum from dogs and cats. **IDEXX Laboratories**, 2018.

BINFORD, G.J.; WELLS, M.A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 135, p. 25-33, 2003.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A., ENGLER, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 4, p. 197-250, 1993.

BOTELHO, A.F.; OLIVEIRA, M.S.D.; SOTO-BLANCO, B.; MELO, M.M. Computerized electrocardiography in healthy conscious guinea pigs (*Cavia porcellus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 1203-1208, 2016.

BOYD, J.W. The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 12, p. 9-24, 1983.

BRICON, T.L. et al. Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis of urinary proteins: Application to multiple myeloma. **Clinical Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 1191-1197, 1998.

CAMPLESI, A.C.; SIMAO, N.M.B; SAKATE, M.; SOBREIRA, M.F.R.; BERSANO P.R.O.; FREITAS, S.H.; MOYA-ARAUJO, C.F. Clinical and laboratory evaluation of dogs experimentally intoxicated with toad venom. **Scientific Journal of Animal Science**, v. 2, n.11, p. 323-333. 2013.

CENTER, S.A.; SMITH, C.A.; WILKINSON, E; ERB H.N.; LEWIS, R.M. Clinicopathologic, renal immunofluorescent, and light microscopic features of glomerulonephritis in the dog: 41 cases (1975–1985). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n.1, p.81-90, 1987.

CERNOCHOVA, H.; HUNDAKOVA, A.; BARDI, E.; KNOTEK, Z. Biochemical profile of urine in guinea pigs (*Cavia porcellus*). **Vet Med-Czech**, v. 65, p. 445-450, 2020.

CHAIM, O.M; SADE, Y.B; DA SILVEIRA. et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAVES-MOREIRA, D.; SENFF-RIBEIRO, A.; WILLE, A.C.M.; et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n.6, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0097-8>.

CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; ZANETTI, V.C.; FERREIRA, A.P.; MINOZZO, J.C.; MANGILI, O.C.; GUBERT, I.C. ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. **Toxicon**, v. 36, n. 4, p. 563-569, 1998.

CHRISTOFF, A.O; OLIVEIRA, A; CHAIM, O.M. et al. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 695-704, 2008.

COLINA, C.; FLORES, A.; CASTILLO, C.; DEL ROSARIO GARRIDO, M.; ISRAEL, A., DIPOLO, R.; BENAÏM, G. Ceramide-1-P induces Ca²⁺ mobilization in Jurkat T-cells by elevation of Ins(1,4,5)-P₃ and activation of a store-operated calcium channel. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 336, n. 1, p. 54-60, 2005.

COLLACICO, K.; CHANQUETTI, A.M.S.; FERRARI, R. Acidente por *Loxosceles* em cão – relato de caso. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. XII, p.179-195, 2008.

COSTA, J.A.C. et al. Insuficiência renal aguda. **Medicina**, v. 36, n.2/4, p.307-324, 2003. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/729>.

CRISTIANO, M.P.; CARDOSO, D.C.; RAYMUNDO, M.S. Contextual analysis and epidemiology of spider bite in Southern Santa Catarina State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 943-948, 2009.

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

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

DA SILVEIRA, R.B., CHAIM, O.M., MANGILI, O.C. et al. 2007. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-β-N-acetyl-d hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 758-768, 2007.

DA SILVEIRA, R.B; DOS SANTOS FILHO, J.F; MANGILI, O.C. et al. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, p. 815-822, 2002.

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

DE CASTRO, C.S., SILVESTRE, F.G., ARAUJO, S.C., GABRIEL DE, M.Y., MANGILI, O.C., Cruz, I., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, p. 273-280, 2004.

DE MIRANDA, A.L.S. et al. History, challenges and perspectives on *Loxosceles* (brown spiders) antivenom production in Brazil. **Toxicon**, v. 192, p. 40-45, 2021.

DE OLIVEIRA, C.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. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, p. 695-704, 2008.

DIAS-LOPES, C.; FELICORI, L., GUIMARÃES, G. et al. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1426-1435, 2010.

DIBARTOLA, S.P.; WESTROPP, J.L. Urinary tract disorders. In: Nelson RW, Couto CG, editors. **Small Animal Internal Medicine**. 5th ed. St. Louis, USA: Elsevier-Mosby; p. 629-712, 2014.

DOMINGOS, M.O.; BARBARO, K.C.; TYNAN, W.; PENNY, J.; LEWIS, D.J.M.; NEW, R.R.C. Influence of sphingomyelin and TNF- α release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 471-479, 2003.

ELSTON, D.M.; EGGERS, J.S.; SCHMIDT, W.E. et al. Histological findings after brown recluse spider envenomation. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 22, p. 242-246, 2000.

ENGLE, S.K. et al. Qualification of cardiac troponin I concentration in mouse serum using isoproterenol and implementation in pharmacology studies to accelerate drug development. **Toxicologic Pathology**, v. 37, p. 617-628, 2009.

ESHAR, D. Exotic Small Mammals'urinalysis and Urinary Diseases. 2015. Disponível em: <https://www.isvma.org/wp-content/uploads/2016/10/Exoticsmallmammalsurinalysisandurinarydiseases.pdf>

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibronogenolytic activities in Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n.7, p. 1039-1051, 1998.

FERRARA, G.I.S; PEDROSA, M.F.F; AZEVEDO, I.L.M.J. et al. Smase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**, v. 53, p. 743-753, 2009

FERRER, V.P.; DE MARI, T.L.; GREMSKI, L.H. et al. A novel hyaluronidase from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n.5, p. 2206, 2013.

FRANÇA, F.O.; BARBARO, K.C.; ABDULKADER, R.C. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 287-290, 2002.

FREITAS, M.V.; FERREIRA, F.S.; BARRETTO, F.L.; BAPTISTA, C.B. Creatinofosfoquinase-isoenzima MB (CK-MB) e Troponina I (cTnI) em cães Revisão de Literatura. **MEDVEP. Revista Científica de Medicina veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 11, p. 156-165, 2014.

FUTRELL J.M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, p. 261- 267, 1992.

FUTRELL, J.M.; MORGAN, B.B.; MORGAN, P.N. An in vitro model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v. 17, n. 4, p. 355-62, 1979.

GAFFNEY, P.J. Fibrin degradation products: a review of structures found in vitro and in vivo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 594–610, 2001.

GALLO, M. et al. Lactic dehydrogenase and cancer: an overview. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 20, p.1234–1249, 2015.

GIORI, L. et al. High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis on urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p.682-690, 2011.

GOMEZ, H.F.; MILLER, M.J.; WAGGENER, M.W.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spider species. **Toxicon**, v. 39, p. 817-824, 2001.

GOMEZ, H.F.; GREENFIELD D.M.; MILLER M.J.; WARREN J.S. Direct correlation between diffusion of *Loxosceles reclusa* venom and extent of dermal inflammation. **Academic Emergency Medicine**, v. 8, p. 309-314, 2001.

GOMEZ, H.F.; MARK J.M.; JOSEPH W. et al. Intradermal anti-*Loxosceles* Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Academic Emergency Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1195-1202, 1999.

GRAUER, G.F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n.10, p. 469–478, 2005.

GRAUER, G.F. Diretrizes de tratamento para doença renal crônica em cães e gatos. **IRIS** (International Renal Interest Society), 2017.

GREMSKI, L. H.; DA JUSTA, H. C.; POLLI, N. L. C.; SCHLUGA, P. H. D. C.; THEODORO, J. L.; WILLE, A. C. M.; VEIGA, S. S. Systemic loxoscelism, less frequent but more deadly: the involvement of phospholipases D in the pathophysiology of envenomation. **Toxins**, v. 15, n. 1, p. 17, 2022.

GREMSKI, L.H. et al. Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins? **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 27, p.1-15, 2021.

GREMSKI, L.H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91-120, 2014.

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. Forty Years of the Description of Brown Spider Venom Phospholipases-D. **Toxins**, v. 12, n.3, p.164, 2020.

GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403-2416, 2010.

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.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, 2014.

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.; et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91–120, 2014.

HAASE, M.; BELLOMO, R.; DEVARAJAN, P.; SCHLATTMANN, P.; HAASE-FIELITZ, A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 54, n. 6, p. 1012-1024, 2009.

HALL, J. A., YERRAMILLI, M., OBARE, E., LI, J., YERRAMILLI, M., & JEWELL, D. E. Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in cats with kidney stones. **PloS One**, v. 12 n. 4, p.1-11, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174854>

HARKNESS J.E., et al. **Harkness and Wagner's Biology and Medicine of Rabbits and Rodents**. 5ª edição, Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010.

HARRIS, R.S., HERDAN G., ANCILL R.J., et al. A quantitative comparison of the nucleated cells in the right and left humeral bone marrow of the guinea pig. **Blood**, v.9. p. 374-378, 1954.

HEIN J., HARMANN K. Reference ranges for laboratory parameters in guinea pigs. **Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere**, v. 31. p. 383-389, 2003.

HOGAN, C.J; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, v. 44, p. 608-624, 2004.

HYDE, T.A.; DRAISEY, T.F. **Principles of chemical pathology**. 1974.

ILCHYSHYN, N.P.; VILLIERS, E.; MONTI, P. Validation of a spectrophotometric method for GGT measurement in canine urine and determination of the urine GGT-to-creatinine ratio reference interval and biological variation in 41 healthy dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 33-39. 2019.

ISBISTER, G.K.; FAN, H.W. Spider bite. **Lancet**, v. 378, p. 2039 – 2047, 2011.

JAFFE, M.Z. Methods determining creatinine. **Physiological Chemistry**, v.10, p.39-40, 1886.

JAIN, N.C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JENKINS, J.R. Evaluation of the rabbit urinary tract. **Journal of Exotic Pets Medicine**, v. 14, n.4, p: 271-9. 2010.

JOHNSON, A.M. Aminoácidos e proteínas. **Fundamentos de Química Clínica**. Elsevier. p. 295-325, 2008.

KACZYNSKA, A.; PELSERS M.M.; BOCHOWICZ A., et al. Plasma heart-type fatty acid binding protein is superior to troponin and myoglobin for rapid risk stratification in acute pulmonary embolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 371, p. 117-123, 2006.

KALAPOTHAKIS, E.; ARAUJO, S.C.; DE CASTRO, C.S. et al. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONÇALVES-DORNELAS, H. et al. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic Press, New York. 1997.

KELLER, P. Enzyme activities in the dog: tissue analyses, plasma values, and intracellular distribution. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 4, p. 575-582, 1981.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochemical and Biophysics Acta**, v. 678, p. 467-476, 1981.

LEES, G.E. et al. Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004. ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19. n.3. p. 377-385, 2005.

LI, F., ZHANG, D., FUJISE, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47542-47549, 2001.

LIFE DIAGNOSTICS. Cardiac Biomarker ELISA Kits. Disponível em: <https://lifediagnosics.com/pt/cardiac-biomarker-elisa-kits/>. 2022

LOPES, P.H. et al. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* Spider envenomation: literature and case review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1461-1477, 2020.

LOPES, S.D.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.D.; EMANUELLI, M.P. **Manual De Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: UFSM-Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

LUCIANO, M.N.; SILVA, P.H.; CHAIM, O.M. et al. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) venom in renal tissue. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, n. 4, p. 455-467, 2004.

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International Journal of Dermatology**, v. 39, p. 287–289, 2000.

MACCHIAVELLO, A. Cutaneous arachnoidism experimentally produced with the glandular poison of *Loxosceles laeta*. **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 23, p. 280-293, 1947.

MACHADO, L.F.; LAUGESSEN, S.; BOTELHO, E.D.; RICART, C.A.; FONTES, W.; BARBARO, K.C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M.V., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, p. 2167-2176, 2005.

MACHADO, L.H.A.; ANTUNES, M.I.P.P.; MAZINI, A. M. et al. Necrotic skin lesion in a dog attributed to *Loxosceles* (Brown Spider) Bite: A Case Report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, p. 572-581, 2009.

MALAUQUE, C.M.S.; ORI, M.; SANTOS, S.A. et al. Production of TNF- α by primary cultures of human keratinocytes challenged with *Loxosceles gaucho* venom. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, n.3, p.179-182, 1999.

MALAUQUE, C.M.S. et al. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139-143, 2002.

MALAUQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C. et al. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, n.3, p.139-143, 2002.

MALAUQUE, C.M.S.; SANTORO, M.L.; CARDOSO, J.L.C.; CONDE, M.R.; NOVAES, C.T.G.; RISK, J.Y.; FRANÇA, F.O.S.; DE MEDEIROS, C.R.; FAN, H.W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, p. 644–663, 2011.

MANCINELLI, E.; SHAW, D.J.; MEREDITH, A.L. γ -Glutamyl-transferase (GGT) activity in the urine of clinically healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Veterinary Record**, v. 171, n.19, p. 475, 2012. doi: 10.1136/vr.101081

MANNING P.J.; WAGNER J.E.; HARKNESS J.E. Biology and diseases of guinea pigs. **Laboratory Animal Medicine**. Orlando: Academic Press; p.149-177, 1994.

MANTOPOULOS D.; HENDERSHOT A.J.; CEBULLA C.M.; HIRSH D.K. Bilateral optic neuropathy following bite from brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 35. n. 2, p. 168-72, 2016.

MARSHALL, T.; WILLIAMS, K.M. Electrophoretic analysis of Bence Jones Proteinuria. **Electrophoresis**, v. 20, n. 7, p.1307-1324, 1999.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, un problema de salud en el Peru. **Boletín Sanitario del Panamá**, v. 103, p. 378–386, 1987.

MARTINS, G.D.C.; BARRETO, M.S O.; BOTELHO, A.F.M.; GAMBA, C.; DUARTE, C. G.; SOTO-BLANCO, B.; MELO, M.M. Evaluation of mesenchymal cells and dapsona for the treatment of dermonecrotic wounds caused by *Loxosceles laeta* venom in rabbits. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, p.1-11, 2022. doi: 10.1590/1809-6891v23e-72573E

MARTINS, G.D.C. Tratamento da lesão dermonecrotica induzida pelo veneno de *Loxosceles laeta* com dapsona e células-tronco mesenquimais. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MATSUBARA, F.H.; GREMSKI, L.H.; MEISSNER, G.O.; SOARES, E.C.L.; GREMSKI, W., CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, v. 71, p.147-178, 2013.

MCDONALD, S.M.; RAFNAR, T.; LANGDON, J.; LICHTENSTEIN, L.M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. **Science**, v. 269, p. 688–690, 1995.

MCGLASSON D.L.; HARROFF H.H.; SUTTON J.; DICK E.; ELSTON D. M. Cutaneous and systemic effects of varying doses of brown recluse spider venom in a rabbit model. **Clinical Laboratory Science Journal**, v. 20, p. 99-105, 2007

MEDVED L.; NIEUWENHUIZEN W. Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 89, p. 409-419, 2003.

MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P.G.P.; JUNIOR, D.V. et al. Araneísmo. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n. 44, p. 98-107, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: SVS - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2023. <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>

MOURA, J.F. Caracterização imunoquímica e molecular da fração dermonecrótica do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia*. Belo Horizonte, 2005. 146p. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Departamento de farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NOWATZKI, J.; DE SENE, R.V.; PALUDO, K.S.; VEIGA, S.S.; OLIVER, C.; JAMUR, M.C.; NADER, H.B.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. **Toxicon**, v. 56, p.535–43, 2010.

NOWATZKI, J.; SENE, R.V.; PALUDO, K.S.; RIZZO, L.E.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; VEIGA, S.S.; TRINDADE, E.S. Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 396-405, 2012.

OKAMOTO, C.K.; VAN DEN BERG, C.W.; MASASHI, M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. Tetracycline reduces kidney damage induced by *Loxosceles* spider venom. **Toxins**, v. 9, n. 3, p. 90, 2017.

OSPEDAL, K.Z.; APPEL, M. H.; NETO, J.F. et al. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, p. 287–294, 2002.

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

PARRAH, J.D.; MOULVI, B.A.; HUSSAIN S.S.; SHEIKH, B. Innovative tube cystostomy for the management of- bovine clinical cases of obstructive urolithiasis. **Veterinarski Arhiv Journal**, v. 81, n. 3, p. 321-337, 2011.

PARRAH, J.D.; MOULVI, B.A.; GAZI, M.A; MAKHDOOMI, D.M.; ATHAR H., DIN, M.U., DAR, S.; MIR, A.Q. Importance of urinalysis in veterinary practice – A review. **Veterinary World**, v. 6, n. 9, p. 640-646. 2013.

PASTORE, C.A.; PINHO, J.A.; PINHO, C.; SAMESIMA, N.; PEREIRA, H.G.; KRUSE, J.C.L.; ATANES, S. M. III Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre análise e emissão de laudos eletrocardiográficos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, p. 1-23, 2016.

PATEL, K.D; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G.A. et al. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 2, p. 631-642, 1994.

PAULI, I; MINOZZO, J.C; SILVA, P.H; CHAIM, O.M; VEIGA, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, p. 660-671, 2009.

PEDROSA, M.F.F., JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L., GONCALVESDE-ANDRADE, R.M. et al. Molecular cloning and expression of afunctional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 5, p. 638–645, 2002.

PETRELLI, F. et al. Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis. **Melanoma Research**, v. 29, p. 1-12, 2019.

PETRELLI, F. et al. Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: a systematic review and meta-analysis of 76 studies. **Acta Oncology**, v. 54. p. 961-970. 2015.

PICHARDO-RODRIGUEZ, R.; GRANDEZ-URBINA, J.A. Loxoscelismo y cambios en el perfil de coagulación. **Revista Chilena de Infectología**, v. 33, n. 6, p. 712, 2016.

PLENGE-TELLECHEA, L.F.; HERNÁNDEZ-RAMOS, Á.D.; MUÑOZ, J.M., BARRAZA-GARZA, G., RICO-ESCOBAR, E., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, D. Acanthocytosis and brain damage in area postrema and choroid plexus: Description of novel signs of *Loxosceles apachea* envenomation in rats. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2. 2019. e0211689. doi: 10.1371/journal.pone.0211689. eCollection 2019.

POLLI, N.L.C. Proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de aranhas do gênero *Loxosceles* utilizando fosfolipases-D mutadas recombinantes como antígeno. 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PRUSZCZYK, P. N-Terminal Pro-Brain Peptide as an Indicator of Right Ventricular Dysfunction. **Journal of Cardiac Failure**, v. 11. pp. 65-69. 2005.

QUESENBERRY, K.E.; DONNELLY, T.M.; MANS, C.H. Biology, husbandry, and clinical techniques of guinea pigs and chinchillas. In: Quesenberry KE, Carpenter JW, editors. **Ferrets, rabbits and rodents: Clinical medicine and surgery**. 3rd ed. St. Louis, USA: Elsevier; p. 279-94. 2012.

REES, R.S.; NANNEY, L.B.; YATES, R.A.; KING JR, L.E. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: the inciting mechanism? **Journal of Investigative Dermatology**, v. 83, p. 270–275, 1984.

REGO, A.B.A.S.; KOGIKA, M.M.; SANTORO, M.L.; HAGIWARA, M.K., MIRANDOLA R.M.S. et al. Eletroforese das proteínas urinárias de cães normais e cães com doença renal em gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE). **Veterinária Notícias**, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2001.

RELFORD, R.; ROBERTSON, J.; CLEMENTS, C. Symmetric dimethylarginine improving the diagnosis and staging of chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, Philadelphia, v. 46, n. 6, p. 941-960, 2016.

REVELO, M.P.; ARATIJO, R.C.; Rodrigues, M.C.; Santos, R.M.; MACIEL, F.C. FERREIRA, A.P.; DINIZ, C.R., BAMBIRRA, O.C.; MANGILI, O.C.; ORTOLEGUI, C.C. Body distribution of *Loxosceles intermedia* spider venom in mice and effects of specific antivenom. **Conference Abstract**. In: **Toxicon**, pp.572, 2000.

RIBEIRO, L.A.; EICKSTEDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONOLSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; DE CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no estado do Paraná (Brasil). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p.19–26, 1993.

RIOS, D.R.A.; DAS GRAÇAS CARVALHO, M.; DA SILVA, B.L.R.; NASCIMENTO, G.D.C.P.; SANTOS, T.L.M. **Atlas De Hematologia**. 2002.

RIZZI, T. E.; VALENCIANO, A. C.; BOWLES, M.; COWELL, R. L.; TYLER, R.; DENICOLA, D. B. Atlas of canine and feline urinalysis. John Wiley & Sons, 2017.

RODRIGUES, G.M. Secretoma no tratamento de lesão dermonecrotica induzida pelo veneno de *Loxosceles intermedia*. Belo Horizonte, 2021. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciência animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ROSEN, J.L.; DUMITRU, J.K.; LANGLEY, E.W.; MEADE OLIVIER, C.A. Emergency department death from systemic loxoscelism. **Annals of Emergency Medicine**, v. 60, p. 439-441, 2012.

SADE, Y.B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H. et al. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, p. 170-177, 2012.

SANTILLI, R.; MOÏSE, N.S; PARIAUT, R.; PEREGO, M. Eletrocardiografia de cães e gatos – Diagnóstico de Arritmias. São Paulo: Editora MedVet, 2 ed., 2018.

SCHAEFER, H.; KOHN, B.; SCHWEIGERT, F.J.; et al. Quantitative and qualitative urine excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p.1292-1297, 2011.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, p. 403-415, 1989.

SCHULTZE A.; JENSEN R. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 4, p. 93-97, 1998.

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. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 210-218, 2008.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; KOWLASKI, L. et al. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, p. 546-548, 1998.

SILVA, P.H; HASHIMOTO, Y; dos SANTOS, F.A. et al. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.42, p.155-161, 2003.

SILVEIRA, R.B.; FEITOSA, L.; HAOACH, J., MANGILI, O.C., Veiga, SS, GREMSKI, W. *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom: identification of a high molecular weight enzyme with broad specificity activity. **Toxicon**, v .38, p. 487-595, 2000.

SITPRIJA, V.; SITPRIJA, S. Renal effects and injury induced by animal toxins. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 943-953, 2012.

SMITH, C.W.; MICKS, D.W. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider. **Laboratory Investigation**, v. 22, p. 90-93, 1970.

SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B; LIMA, J.C.C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

STEVENS L.A.; LEVEY A.S. Measurement of kidney function. **Medical Clinics of North America**, v. 89, n.3, p. 457-73, 2005.

SUNDERKOTTER, C.; SEELIGER, S.; SCHONLAU, F. et al. Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. **Experimental Dermatology**, v.10, p. 391-404, 2001.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 7, p. 700-707, 2005.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Journal of Clinical Dermatology**, v. 24, p. 213 – 221, 2006.

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. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complementdependent hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 25, p. 366–73,1998

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VON EICKSTEDT, V.R.; BENEDETTI, Z.C.; PETRICEVICH, V.L.; DA SILVA, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **The Journal of Immunology**, v. 155, p. 4459-4466, 1995.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, p. 683–691, 2000.

TAMBOURGI, D.V.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; MAGNOLI, F.C.; PAUL MORGAN, B.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **Journal of Investigation Dermatology**, v. 124, p. 725-731, 2005.

TAMBOURGI, D.V.; PEDROSA, M.F.; DE ANDRADE, R.M.; BILLINGTON, S.J.; GRIFFITHS, M.; VAN DEN BERG, C.W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 576–582, 2007.

TAMBOURGI, D.V.; PETRICEVICH, V.L.; MAGNOLI, F.C.; ASSAF, S.L.M.R.; JANCAR, S.; SILVA, W.D. Endotoxemic like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 391-403. 1998.

TAMBOURGI, D.V.; DA SILVA, M.S.; BILLINGTON, S.J.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; SONGER, J.G; VAN DER BERG, C.W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 93-101, 2002.

TAMBOURGI, D.V; GONÇALVES-DEANDRADE, R.M; VAN DEN BERG, C.W. Loxoscelism: from basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v.56, p.1113-1119, 2010.

TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. Comparative biochemistry and physiology. **Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 299-302, 1992.

TAVARES, F.L.; PEICHOTO, M.E.; RANGEL, D.M. et al. *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1567-1574, 2011.

TAVARES, F.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C.; REBECCHI, I.M.; SANO-MARTINS, I.S. Changes in hematological, hemostatic and

biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, p. 477-486, 2004.

THAMER, I.K.; RASHEED, K.N.; EBRAHEEM, A.H.; HAMEED, B.K. A comparative study of the blood film (histological structure of red blood cells and white blood cell and their count) in laboratory animals. **Biochemical and Cellular Archives**, v. 19, n. 1, p. 2191-2198, 2019

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2 ed. 2012.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3 ed. 2017.

THYGESEN, K. ALPERT, J.S. WHITE, H.D. Universal definition of myocardial infarction. **European Heart Journal**, v. 28, n. 20, p. 2173-2195, 2007.

TILLEY, L.P. Essentials of canine and feline electrocardiography: interpretation and treatment. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992.

TILLEY, L.P.; BURTNICK, N.L. ECG Eletrocardiografia Para O Clínico De Pequenos Animais. São Paulo: Roca, 2004.

TRIPODI, A. D-dimer testing in laboratory practice. **Clinical chemistry**, v. 57, n. 9, p. 1256-1262, 2011.

VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C., MARCHBANK, K.J.; TAMBOURGI, D.V. *Loxosceles* spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/CD46 and MHCI and induces protection against C-mediated lysis. **Immunology**, v. 107, p.102–110, 2002.

VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L. et al. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, p. 825-839, 2000.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A., MANGILI, O.C., GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brazil Journal of Medical Biology Research**, v. 34, p. 843-850, 2001a.

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

VETTER, R.S. Clinical consequences of toxic envenomation by spiders. **Toxicon**, v. 152, p. 65-70, 2018.

VETTER, R.S.; ISBISTER, G.K. Medical Aspects of Spider Bites. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 409-429, 2008.

VETTER, R.S.; SWANSON, D.L. Bites of Recluse Spiders. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/bites-of-reclusespiders>, 2022.

VIDIGAL, P.G. Investigação laboratorial do paciente com disfunção renal. **Medicina Laboratorial para o Clínico**, v. 3, p. 439-468, 2009.

WARD, P.A.; COCHRANE, C.B. Bound complement and immunologic injury of blood vessels. **Journal of Experimental Medicine**, v. 121, p. 215–234, 1965.

WESCHE P. Rodents: Clinical pathology. In: Keeble E, Meredith A, editors. **BSAVA manual of rodents and ferrets**. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association; p. 42-51, 2009.

WILLIAMS, S.T.; KHARE, V.K.; JOHNSTON, G.A.; BLACKALL, D.P. Severe intravascular hemolysis associated with brown recluse spider envenomation. A report of two cases and review of the literature. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 104, n.4, p. 463–467, 1995.

WORLD SPIDER CATALOG. **World Spider Catalog**, v. 23, 2022.

ZAHOREC, R. et al. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts-rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 102, n. 1, p. 5-14, 2001.

ZANETTI, V.C.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel

damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood, Coagulation & Fibrinolysis**, v. 13, p. 135–48, 2002.

ZARAGOZA C. et al. SDS-PAGE and Western Blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 137 -151, 2003.

ZOBEL-THROPP, P.A.; KERINS, A.E.; BINFORD, G.J. Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. **Toxicon**, v. 60, p. 265–71, 2012.