

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Perfil hematológico e mielograma de coelhos experimentalmente inoculados
com veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) tratados com
secretoma

Maria Elvira de Almeida

BELO HORIZONTE

2022

MARIA ELVIRA DE ALMEIDA

Perfil hematológico e mielograma de coelhos experimentalmente inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom) tratados com secretoma

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção de grau de Doutora em Ciência Animal

Orientadora: Profa. Marília Martins Melo
Coorientador: Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Coorientador: Prof. Carlos Delfin Chávez-Olórtegui

BELO HORIZONTE – MG

Escola de Veterinária - UFMG

2022

A447p Almeida, Maria Elvira de, 1979-
Perfil hematológico e mielograma de coelhos experimentalmente inoculados com veneno de *Loxosceles
Intermedia* (aranha marrom) tratados com secretoma/ Maria Elvira de Almeida. -2022.
59 f.:il

Orientadora: Marília Martins Melo
Coorientadores: Paulo Ricardo de Oliveira Paes
Carlos Delfin Chávez Olórtegui
Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora.
Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias.
Bibliografias: f: 45 -48.

1. Coelho como animal de laboratório - Teses - 2. Aranha marrom - Veneno - Teses - 3. *Loxosceles* –
Veneno - Teses - I. Melo, Marília Martins - II. Paes, Paulo Ricardo de Oliveira - III. Chávez Olórtegui, Carlos
Delfin - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089 5

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA ELVIRA DE ALMEIDA

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

Aprovada em 31 de maio de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marília Martins Melo
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Roberto Baracat de Araújo

Dr.(a). Rubens Antônio Carneiro

Dr.(a). Ana Flávia Machado Botelho

Dr.(a). Guilherme De Caro Martins



Documento assinado eletronicamente por Marília Martins Melo, Professora do Magistério Superior, em 31/05/2022, às 20:21, 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 01/06/2022, às 15:33, 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 Ana Flávia Machado Botelho, Usuário Externo, em 01/06/2022, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rubens Antonio Carneiro, Professor do Magistério Superior, em 01/06/2022, às 17:02, 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 Guilherme de Caro Martins, Usuário Externo, em 13/06/2022, às 15:08, 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 1493571 e o código CRC F39817D6.

Dedico esse trabalho à minha mãe e à minha Mamadia.

Agradecimentos

Segundo o dicionário agradecimento é o “reconhecimento e declaração de se estar grato por algo dado ou feito por outrem”. Na verdade, essa definição é muito vaga perto das benesses proporcionadas por cada um de vocês ao longo da minha caminhada.

A Deus, agradeço a saúde e bençãos alcançadas na longa estrada da vida. Sem a Sua presença, o meu caminhar teria sido mais árduo. A São Francisco de Assis, protetor dos animais, por seus ensinamentos e escutar as minhas inúmeras preces, principalmente no exercício da medicina veterinária.

Aos meus pais, por serem exemplos de honradez, saberem escutar, aconselharem e incentivarem a busca do conhecimento. As minhas irmãs, por estarem sempre ao meu lado e aos meus sobrinhos, por serem uma fonte de energia e alegria nos meus dias. Aos meus avôs Dico e Dina, *in memoriam*, por terem tornado o meu mundo mais doce. Aos tios Dão e Maria, meus padrinhos, por estarem presentes e vibrarem por cada conquista.

A querida professora Marília, minha orientadora, pelos ensinamentos, conselhos, paciência e incentivo, principalmente nos momentos em que pensei desistir. A minha admiração por você surgiu durante uma aula de disciplina isolada nos meados de 2013 e desde então essa admiração só cresce.

Aos professores Carlos Chávez-Olórtegui e Paulo Ricardo Oliveira Paes, meus coorientadores, pela valiosa ajuda nesse projeto.

A Mariah, meu presente do doutorado, não tenho palavras para agradecer toda ajuda, paciência, parceria e amizade.

Ao professor Pinho, obrigada pelas prazerosas e incontáveis conversas e pelas ideias que surgiram a partir desses momentos, além dos incentivos aos longos desses quatro anos.

Aos professores Marcos e Soraia, mestres e amigos, por fazerem parte da realização do meu doutorado quando ele ainda era um sonho, por serem confidentes das minhas conquistas, dos meus medos e angústias, além de terem sempre uma palavra de incentivo, mostrando caminhos, formas e maneiras de continuar seguindo em frente. Uma das frases de Martin Luther King Jr. nunca teve tanto sentido: “é melhor tentar e falhar que preocupar-se e ver a vida passar” ...

A professora Fabíola, pelo dom de me fazer sentir mais leve em todas as nossas conversas. Você sempre esteve presente, disposta a escutar, ensinar e tirar dúvidas (mesmo as mais simples). Obrigada por permitir que a Bibi me ajudasse a cuidar dos coelhos durante o experimento.

A Bibi, pela ajuda, risadas e docilidade nos momentos em que ajudou a cuidar dos coelhos.

Ao professor Raphael, por ter realizado a estatística do meu trabalho, principalmente por compreender as minhas limitações com o universo da estatística.

Ao professor Rubens, por estar sempre ao meu lado durante o meu caminhar e por todas as portas que me ajudou abrir.

Ao Ricardo Laub, por toda a presteza na etapa final do meu experimento e ensinamentos durante o processamento das amostras.

As técnicas do laboratório de Histopatologia, Leimar e Valéria, por estarem sempre disponíveis a me ensinar e tirar as minhas dúvidas.

Ao meu grande amigo Senos, que sempre esteve presente em minha vida desde o momento em que nossos destinos se cruzaram enquanto eu borboleteava pelo pátio da faculdade. Obrigada pelas sábias palavras que me deram força para finalizar a escrita da tese.

A minha Duquesa, que sempre trouxe leveza e docilidade aos meus dias. Nada na vida acontece por acaso, né?! Lá se vão 18 anos desde o início da nossa amizade. Obrigada por estar presente mesmo com os 439 km que nos separam.

A Gaby Rodrigues, com quem tive a honra de trabalhar e compartilhar parte do experimento.

A toda a equipe da Toxicologia, em especial as alunas de iniciação científica, Jessica, Fran, Paula e Lygia que foram fundamentais nos cuidados com os animais e na execução do projeto.

Aos animais, por serem instrumentos dos ensinamentos do Criador e de São Francisco de Assis.

*“When I find myself in times of trouble
Mother Mary comes to me
Speaking words of wisdom
Let it be”*

Lennon & McCartney

Resumo

Os acidentes com animais peçonhentos são um importante problema de saúde pública nos países tropicais, incluindo os relacionados com as aranhas do gênero *Loxosceles*. O veneno aranha *Loxosceles intermedia* é responsável por uma síndrome clínica, caracterizada por alterações locais e sistêmicas, decorrentes da ação direta e/ou indireta do veneno. O objetivo desse estudo foi avaliar e correlacionar as alterações hematológicas e do mielograma em coelhos envenenados experimentalmente com veneno da *L. intermedia* e tratados com secretoma por via intradérmica (ID) e endovenosa (EV). Foram utilizados 16 coelhos Nova Zelândia, machos e adultos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=4). O grupo controle (GI) foi desafiado com NaCl 0,9% e tratado com 60µg de secretoma diluído em tampão fosfato-salina a 0,5% (PBS) por via ID. Os demais grupos (GII, GIII e GIV) receberam a aplicação de 10µg de veneno de *L. intermedia*, diluídos em NaCl 0,9% via ID. Após 30 min da inoculação do veneno, os grupos receberam os seguintes tratamentos: grupo II, NaCl 0,9% via ID; grupo III, 60µg de secretoma diluído em PBS via ID; grupo IV, 60µg de secretoma diluído em PBS, via EV. Foram realizadas coletas de sangue para avaliação hematológica antes (tempo 0) e após a inoculação do veneno e tratamentos, no terceiro, nono e 15º dias. Após 15 dias os animais foram eutanasiados e em seguida foi realizada a coleta da medula óssea. O secretoma por via ID, não foi capaz de evitar o loxoscelismo cutâneo, pois houve presença de halo hemorrágico, edema, lesão dermonecrotica e formação de crosta nos coelhos. O secretoma por via EV, minimizou grandemente o loxoscelismo cutâneo, pois apesar da presença de halo hemorrágico, esse foi menor, associado a ausência de lesão dermonecrotica e formação de crosta. O secretoma causou diminuição de variáveis do eritrograma dos animais que receberam veneno de *L. intermedia*, sendo essa alteração de maior intensidade quando esse tratamento foi por via EV. O veneno da *L. intermedia* causou alterações medulares tais como, diminuição significativa na contagem de rubriblastos e mieloblastos, e aumento significativo na contagem de eosinófilos e megacariócitos. O tratamento com secretoma, tanto por via ID como EV, foi capaz de reverter as alterações medulares causadas pelo veneno de *L. intermedia*, normalizando os valores de rubriblastos, mieloblastos e eosinófilos.

Palavras-chave: loxoscelismo, araneísmo, medula óssea, patologia clínica

Abstract

Accidents with venomous animals are an important public health problem in tropical countries, including those related to spiders of the genus *Loxosceles*. The spider venom *Loxosceles intermedia* is responsible for a clinical syndrome, characterized by local and systemic alterations, resulting from the direct and/or indirect action of this venom. The aim of this study was to evaluate and correlate hematological and myelogram alterations in rabbits experimentally envenomed with *L. intermedia* venom and treated with secretome intradermally (ID) and intravenously (EV). Sixteen male and adult New Zealand rabbits were randomly distributed into four groups (n=4). The control group (GI) was challenged with 0.9% NaCl and treated with 60µg of secretome diluted in 0.5% phosphate-buffered saline (PBS) by the ID route. The other groups (GII, GIII and GIV) received the application of 10µg of *L. intermedia* venom, diluted in NaCl 0.9% via ID. After 30 min of venom inoculation, the groups received the following treatments: group II, 0.9% NaCl via ID; group III, 60µg of secretome diluted in PBS via ID; group IV, 60µg of secretome diluted in PBS, via IV. Blood samples were collected for hematological evaluation before (time 0) and after inoculation of the venom and treatments, on the 3rd, 9th and 15th days. After 15 days the animals were euthanized and then, bone marrow was collected. Secretome by ID route was not able to prevent cutaneous loxoscelism, because, there were a hemorrhagic halo, edema, dermonecrotic lesion and crust formation in rabbits. Secretome via IV route, greatly minimized cutaneous loxoscelism, because, despite the presence of a hemorrhagic halo, it was smaller, associated with the absence of dermonecrotic lesion and crust formation. The secretome caused a decrease in the erythrogram in animals that received *L. intermedia* venom, and this alteration was greater when this treatment was by the IV route. The *L. intermedia* venom caused medullary changes such as a significant decrease in the count of rubriblasts, myeloblasts, and a significant increase in the count of eosinophils and megakaryocytes. Treatment with secretome, both by ID and IV routes, was able to reverse the medullary alterations caused by the venom of *L. intermedia*, normalizing the values of rubriblasts, myeloblasts and eosinophils.

Keywords: loxoscelism, araneism, bone marrow, clinical pathology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características da aranha marrom. A – Dimorfismo sexual de *L. intermedia*. Fêmea com corpo maior e pernas menores que as do macho. B – Em destaque o desenho de violino no cefalotórax indicado pela seta e os três pares de olhos distribuídos em semicírculos indicados com as pontas das setas. Fonte: adaptado de Chaim *et al.* (2011). 18

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Valores médios \pm desvio padrão da contagem de hemácias ($10^6/\mu\text{L}$) de coelhos antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9% e secretoma por via intradérmica e endovenosa..... 35
- Tabela 2:** Valores médios \pm desvio padrão da concentração de hemoglobina (g/dL) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9% e secretoma via intradérmica e endovenosa..... 36
- Tabela 3:** Valores médios \pm desvio padrão de hematócrito (%) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa.. 37
- Tabela 4:** Valores médios \pm desvio padrão de CHGM (g/dL) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), secretoma via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15º dia após desafio e tratamentos 37
- Tabela 5:** Valores médios \pm desvio padrão do número de leucócitos $/\mu\text{L}$, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa 38
- Tabela 6:** Valores médios \pm desvio padrão da contagem de heterófilos $/\mu\text{L}$, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa..... 38
- Tabela 7:** Valores médios \pm desvio padrão da contagem de linfócitos $/\mu\text{L}$ e monócitos $/\mu\text{L}$, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa..... 39
- Tabela 8:** Valores médios \pm desvio padrão da contagem de plaquetas $/\mu\text{L}$, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa 40
- Tabela 9:** Valores médios \pm desvio padrão da contagem do mielograma de coelhos com 15 dias após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa..... 41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Identificação dos grupos experimentais, desafios e tratamentos instituídos. 33

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Objetivos	17
2.1.Objetivos gerais.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Revisão de Literatura.....	18
3.1.Aspectos biológicos do gênero <i>Loxosceles</i>	18
3.2.Veneno de <i>Loxosceles</i>	19
3.3.Loxoscelismo	22
3.4.Alterações hematológicas e medulares	24
3.5.Diagnóstico	26
3.6.Tratamento	27
3.6.1. Células tronco mesenquimais e secretoma.....	27
4. Medula óssea.....	29
5. Material e Métodos.....	32
5.1.Animais	32
5.2.Obtenção do veneno e secretoma de células-tronco mesenquimais.....	32
5.4.Análises Laboratoriais	33
5.5 Estatística.....	34
6. Resultados e Discussão	35
6.1 Avaliação hematológica	35
6.1.1. Eritrograma	35
6.1.2. Leucograma.....	37
6.1.3. Plaquetas	39
6.2 Mielograma.....	40
7. Conclusões	44
8. Referências Bibliográficas	45
9. Anexos.....	59
9.1.Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	59

1. Introdução

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) referentes ao ano de 2021, os acidentes por animais peçonhentos são negligenciados, constituindo um sério problema de saúde pública. Não obstante, o Brasil é considerado um dos países com maior experiência no diagnóstico e tratamento desses tipos de acidentes. Deste modo, sabe-se que a utilização direta de antivenenos não tem uma grande eficácia, se fazendo necessária a busca por novas terapias que aumentem sua eficácia e qualidade.

No Brasil, existem três gêneros de aranha de importância médica: *Loxosceles*, *Phoneutria* e *Lactrodectus*, que são responsáveis por muitos acidentes (Cristiano *et al.*, 2009). Desses, os acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles* representam a maioria dos casos notificados, de acordo com dados de 2021 do Ministério da Saúde (MS).

As aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas popularmente como “aranhas marrons” por apresentarem uma coloração que varia do marrom claro ao marrom escuro, são responsáveis por acidentes em todos os continentes, exceto na Antártida (Silva *et al.*, 2004). São aranhas pequenas que possuem tamanho corporal entre 8 e 15 mm de comprimento com as patas alongadas que chegam a 30 mm. Apresentam dimorfismo sexual, sendo que os machos têm o corpo menor e as patas mais alongadas que as fêmeas. Possuem características específicas que auxiliam na sua identificação, como o cefalotórax em forma de violino, o que faz com que elas também sejam conhecidas como “aranhas violino” e a disposição dos pares de olhos: um par frontal e dois pares laterais (Futrell, 1992; Malaque *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004). Essas aranhas possuem hábitos noturnos, são sedentárias e não são agressivas (Andrade *et al.*, 1999). Vivem em locais escuros e secos, embaixo de pedras e madeiras, além de casca de árvores e cavernas, e podem ser encontradas em ambientes peridomiciliares e dentro das residências (Malaque *et al.*, 2002). Os acidentes normalmente ocorrem quando as aranhas são comprimidas contra o corpo da vítima (Futrell, 1992).

O veneno dessas aranhas é uma mistura complexa de enzimas (Veiga *et al.*, 2000a), ocasionando uma síndrome clínica chamada de loxoscelismo que pode resultar em alterações locais e sistêmicas em seres humanos e nos animais (Futrell, 1992), sendo as lesões decorrentes da ação direta e/ou indireta do veneno (Abdulkader *et al.*, 2008; Burdmann e Jha, 2017).

No Brasil há 18 espécies de *Loxosceles* descritas (World Spider Catalog 2021), porém somente as espécies *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* estão relacionadas com acidentes no país (Malaque *et al.*, 2002; Andrade e Tambourgi, 2003), que ocorrem predominantemente nas regiões sudeste e sul (Tavares *et al.*, 2004). A espécie *L. amazonica* também tem importância médica, pois está relacionada com acidentes no estado do Ceará (Azevedo *et al.*, 2014; Silveira, 2015).

Barbaro *et al.* (1996) estudaram a atividade biológica, em camundongos, dessas três espécies e demonstraram que o veneno da *L. intermedia* é o mais letal (DL₅₀ 0,48 mg/kg), seguido da *L. gaucho* (DL₅₀ 0,60 mg/kg) e *L. laeta* (DL₅₀ 1,45 mg/kg). Em humanos, o veneno de *L. intermedia* parece ser o responsável pelas manifestações mais graves do loxoscelismo (Sezerino *et al.*, 1998).

A picada das aranhas do gênero *Loxosceles* produz uma lesão necrótica local que pode resultar em alterações sistêmicas com presença de distúrbios hematológicos (Futrell, 1992; Chaim *et al.*, 2006) e lesão renal (Futrell, 1992; Veiga *et al.*, 2000a). Os dados na literatura sobre as alterações do veneno da *Loxosceles sp.* na medula óssea são escassos, porém Silva *et al.* (2003) observaram a

presença de alterações celulares na medula óssea e no sangue periférico causadas pelo veneno da *L. intermedia* em coelhos, tais como diminuição do número de megacariócitos correlacionada com a trombocitopenia no início do envenenamento, assim como neutropenia periférica e medular devido a migração intensa de neutrófilos para o tecido.

Também é importante ressaltar que as alterações hematológicas, como hemólise e anemia, exacerbada trombocitopenia e leucopenia/leucocitose, são observadas nos quadros sistêmicos, vistos especialmente em cães, contribuindo para o óbito do paciente com loxoscelismo cutâneo-visceral (Branco *et al.*, 2014). Na medicina, o loxoscelismo cutâneo hemolítico também é a forma mais grave sendo caracterizada por hemólise intravascular associada a lesão cutânea (Barbaro e Cardoso, 2003; Malaque *et al.*, 2016; Málaque *et al.*, 2017).

Apesar da vasta literatura médica sobre o loxoscelismo, o manejo da lesão dermonecrotica e das alterações sistêmicas ainda é controverso e, diferentes protocolos terapêuticos têm sido usados em todo o mundo. O tratamento proposto varia de acordo com a gravidade da lesão apresentada (Lopes *et al.*, 2020), como o uso de anti-histamínicos, profilaxia antitetânica e antidiftérica, analgésicos, antibióticos e dapsona. Com relação as alterações sistêmicas, a terapia de suporte (transfusão sanguínea, diálise e hidratação) e uso de corticoides podem ser necessários (Sams *et al.*, 2001; Davanzo *et al.*, 2016). O desbridamento cirúrgico da lesão, enxerto de pele, terapia hiperbárica, curativo a vácuo também são tratamentos propostos para as lesões locais (Sams *et al.*, 2001; Vetter, 2008). Salienta-se que no Brasil, o uso do soro antiloxoscélico é limitado aos pacientes humanos com sinais clínicos moderados à graves (Brasil, 2001) e, de acordo com Malaque *et al.* (2011), em 54,3% dos pacientes humanos acidentados com *Loxosceles*, é utilizada a soroterapia.

O uso de células tronco mesenquimais (CTM), isoladas ou associadas, tem potencial terapêutico no tratamento das lesões dermonecroticas no loxoscelismo conforme observado por Martins *et al.* (2022). Rodrigues (2021) utilizou o secretoma, um composto de células tróficas liberadas pelas CTM, como tratamento da dermonecrose causada experimentalmente por *L. intermedia*. Duas vias foram utilizadas, intradérmica (ID) e endovenosa (EV), no grupo de animais que recebeu o tratamento pela via EV, observou-se, microscopicamente, que houve ativação fibroblástica, desenvolvimento precoce de tecido conjuntivo, neovascularização e reepitelização tecidual, conferindo melhoria significativa no processo de cicatrização da ferida dermonecrotica. Assim, as terapias celulares avançadas, englobadas no conceito da medicina regenerativa, podem ser consideradas uma nova e eficiente alternativa no tratamento de vítimas por animais peçonhentos, principalmente as aranhas do gênero *Loxosceles*.

Diante dos diferentes protocolos terapêuticos existentes e da ausência de um soro antiloxoscélico disponível para uso médico veterinário, é necessária a busca por terapias inovadoras e eficazes que reduzam ao máximo a necrose do tecido local e os danos aos órgãos internos. Têm sido descritas, nos últimos anos, as principais características de muitos tipos de células tronco adultas, dentre elas sua potente capacidade anti-inflamatória e dos seus subprodutos como o secretoma, mas não existem pesquisas que demonstrem sua ação sobre as células sanguíneas circulantes e precursoras, tornando imperativo esse estudo.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar as alterações sanguíneas e medulares causadas pelo veneno de *L. intermedia* em coelhos, tratados com o secretoma.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o hemograma de coelhos após a inoculação do veneno de *L. intermedia*, tratados com secretoma, por via intradérmica e endovenosa.

Analisar o mielograma de coelhos após a inoculação do veneno de *L. intermedia*, tratados com secretoma, por via intradérmica e endovenosa.

3. Revisão de Literatura

3.1. Aspectos biológicos do gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* (Heineken e Lowe 1832) pertencem a família Sicariidae (Gremski *et al.*, 2014) e, apesar de terem distribuição mundial, os acidentes são descritos nas regiões temperadas e tropicais (Silva *et al.*, 2004; Malaque *et al.*, 2016).

Essas aranhas são conhecidas popularmente como “aranhas marrons” por apresentarem uma coloração que varia do marrom claro ao marrom escuro e por apresentarem o formato do cefalotórax semelhante a um violino também são conhecidas como “aranhas violino”. São aranhas de pequeno porte com tamanho corporal médio entre 8 e 15 mm de comprimento e patas alongadas que chegam a 30 mm. Apresentam dimorfismo sexual, sendo que o macho tem o corpo menor e as patas alongadas do que as fêmeas (Figura 1A). Algumas características específicas auxiliam na sua identificação, como o formato do cefalotórax e a disposição dos três pares de olhos (Figura 1), um par frontal e dois pares laterais (Hogan *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

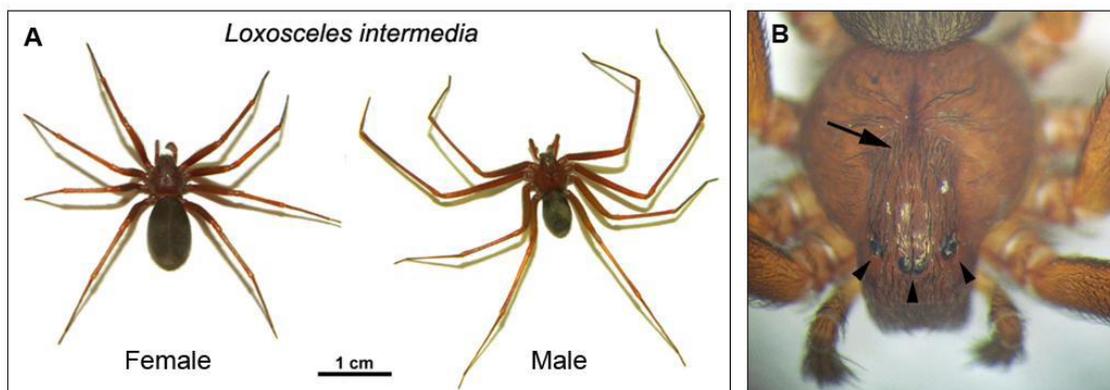


Figura 1. Características da aranha marrom. A – Dimorfismo sexual de *L. intermedia*. Fêmea com corpo maior e pernas menores que as do macho. B – Em destaque o desenho de violino no cefalotórax indicado pela seta e os três pares de olhos distribuídos em semicírculos indicados com as pontas das setas. Fonte: adaptado de Chaim *et al.* (2011).

As aranhas marrons podem ocupar uma variedade de habitats áridos e úmidos, mas preferencialmente áreas escuras. Na natureza, elas são encontradas em fendas ou sob pedras, troncos de árvores e restos vegetais. Já nas áreas urbanas podem ser encontradas em celeiros, garagens e locais com resíduos de construção. Possuem boa adaptação em ambientes domiciliares, o que explica a frequência dos acidentes (Hogan *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

A presença dessas aranhas em ambiente domiciliar é favorecida pelo número reduzido de predadores naturais, pela menor variação de temperatura como o uso de aquecedores e ar-condicionado. Nas áreas sinantrópicas são encontradas em caixas de papelão, atrás de estantes, camas e mesas, dentro de armários, gavetas, sapatos e entre roupas. São animais resistentes, de hábitos noturnos e sobrevivem por longos períodos sem água ou comida e toleram uma ampla faixa de temperatura, de 8 a 43°C (Gremski *et al.*, 2014).

Apesar dessas aranhas terem uma ampla distribuição mundial, os casos de loxoscelismo são mais relatados nas Américas, particularmente no Brasil, onde é observado um aumento considerável de acidentes com as aranhas do gênero *Loxosceles* nos últimos anos (Ribeiro *et al.*, 2020; Brasil, 2021).

Os acidentes relacionados com as aranhas do gênero *Loxosceles* no Brasil são relatados desde o século XIX (Barbaro e Cardoso, 2003), sendo as principais espécies de importância médica *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* (Barbaro e Cardoso, 2003; Silva *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2004). No Brasil, esses acidentes são de notificação obrigatória (Hogan *et al.*, 2004) e dos 27.118 acidentes notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN), representam 6.094 (Brasil, 2021). A maioria dos acidentes ocorre nas regiões sul e sudeste, principalmente no estado do Paraná, que possui o maior número de acidentes notificados. A maior ocorrência dos acidentes é observada nos meses mais quentes do ano (Sezerino, 1998; Malaque *et al.*, 2002; Barbaro e Cardoso, 2003).

Apesar dessas aranhas não serem agressivas, tem-se observado um aumento no número dos acidentes (Malaque *et al.*, 2002). A picada geralmente ocorre em ambiente intradomiciliar, em circunstâncias onde a aranha é comprimida contra o corpo durante o momento de se vestir ou ao dormir, pois se escondem dentro de roupas e lençóis (Sezerino, 1998; Malaque *et al.*, 2002; Barbaro e Cardoso, 2003).

Os dados na medicina veterinária são escassos, porém é observado que o número de casos em animais vem acompanhando o aumento observado na medicina, principalmente pelo hábito intradomiciliar atual da maioria dos animais de estimação (Collacico *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009; Branco *et al.*, 2014).

3.2. Veneno de *Loxosceles*

O veneno da aranha marrom apresenta uma composição complexa, contém muitas moléculas diferentes. Foi no final da década de 1960 e início da década de 1970, que se iniciou a extração de veneno da aranha *Loxosceles* e a identificação de componentes individuais (Smith e Micks, 1968). Morgan (1969), descreveu que o veneno, límpido e altamente viscoso, extraído de uma aranha fêmea adulta contém em média 50µg de proteína.

Também foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), venenos de oito machos e oito fêmeas de aranhas *L. reclusa*, demonstrando-se perfis de toxicidade semelhantes entre espécimes femininos e masculinos e entre espécies distintas, como *L. laeta*, *L. reclusa*, *L. intermedia*, *L. adelaida*, *L. similis* e *L. gaucho* (Norment e Jarratt, 1976). A análise da massa molecular revelou três grupos principais de proteínas com diferentes massas moleculares -30-40 kDa, 20-30 kDa e 2-10 kDa (Geren *et al.*, 1976; Norment e Jarratt, 1976). A purificação parcial das toxinas do veneno por filtração em gel de Sephadex revelou três frações principais: fração A, com atividade hialuronidase; fração B, responsável pela maior atividade dermonecrótica e fração C, sem atividade dermonecrótica (Smith e Micks, 1968; Morgan, 1969, Suarez *et al.*, 1971a,b; Wright *et al.*, 1973, Bordon *et al.*, 2015). Além disso, também foram relatadas atividades de proteases, esterases e fosfatase alcalina no veneno de *Loxosceles* (Jong *et al.*, 1979; Bordon *et al.*, 2015).

Com o uso de diferentes técnicas, tais como a cromatografia de troca catiônica em pH 4,0, foi possível a purificação da fração tóxica responsável pela letalidade em camundongos, indução de

necrose em coelhos, hemólise de hemácias humanas e pela diminuição no tempo de coagulação induzida pelo cálcio no plasma humano (Babcock *et al.*, 1985). Além disso, uma fração do veneno de *L. reclusa* e de *L. laeta* também mostrou efeitos hematológicos adversos em camundongos albinos e coelhos, respectivamente (Chu *et al.*, 1978; Moran *et al.*, 1981). Outros estudos demonstraram anormalidades na hemostasia, incluindo alterações no tempo de tromboplastina (TP), no tempo de protrombina parcial ativada (TTPa), na contagem de plaquetas e na degradação de fibrinogênio-fibrina (Bascur *et al.*, 1982). Além disso, uma fração peptídica de baixa massa molecular de *L. reclusa* mostrou conter componentes letais e neuroativos para insetos (Foil *et al.*, 1979).

A filtração de veneno de aranha de *L. gaúcho*, em gel de Sephadex G 100, resultou em três frações (A, B e C). As atividades dermonecrótica e letal foram detectadas exclusivamente na fração A. A análise por SDS-PAGE mostrou que as proteínas contidas na fração A tem peso molecular de aproximadamente 35.000 e 33.000. A análise de *imunoblotting* mostrou que as proteínas responsáveis pela atividade dermonecrótica e letal são muito imunogênicas e as primeiras a serem detectadas por anticorpos durante o curso da imunização (Barbaro *et al.* 1992).

Tambourgi *et al.* (1998) demonstraram que uma proteína de 35 kDa, denominada F35, purificada do veneno de *L. intermedia*, incorpora-se às membranas das hemácias humanas e as torna suscetíveis à via alternativa do complemento. A proteína F35 foi purificada por cromatografia de fase reversa, mostrando três picos fortemente contíguos denominados P1, P2 e P3. P1 e P2 mostraram-se homogêneos por SDS-PAGE e análise de aminoácidos N-terminal, enquanto P3 consistiu em duas proteínas altamente homólogas. A sequenciação N-terminal de todas as quatro proteínas mostrou um alto grau de homologia, o que foi confirmado pela reatividade cruzada de antissoros criados contra as proteínas individuais purificadas. A caracterização funcional de P1 e P2 indicou a presença de atividade de esfingomielinase e qualquer proteína isolada foi capaz de induzir todos os efeitos *in vivo* observados com veneno bruto, incluindo hemólise complemento-dependente e dermonecrose. Em todos os ensaios, P2 foi mais ativa que P1, enquanto P3 foi completamente inativa. Esses dados mostram que diferentes efeitos biológicos do veneno de *L. intermediam* podem ser atribuídos à atividade esfingomielinase de duas proteínas altamente homólogas, P1 e P2.

Atividades de protease também foram encontradas nos venenos de *Loxosceles*, com distintos perfis de massa molecular e preferências de substrato (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000). Com base nas características enzimáticas, elas foram classificadas como metaloproteases e serinoproteases. Duas metaloproteases de aranha marrom foram identificados, a saber, loxolisina A (20 kDa), com atividade sobre fibronectina e fibrinogênio, e loxolisina B (30 kDa), com atividades gelatinolíticas (Feitosa *et al.*, 1998). A respeito de presença de metaloproteases no veneno de *Loxosceles*, duas proteases também foram encontradas no veneno de *L. rufescens*, uma protease fibrogenolítica de 23 kDa e uma protease gelatinolítica de 27 kDa. Suas atividades foram inibidas pela 1,10-fenantrolina, confirmando a característica das metaloproteases (Young e Pincus, 2001, Silveira *et al.*, 2002). A degradação do fibrinogênio ocorreu em diferentes venenos de *Loxosceles*; e, novamente, a inibição da degradação pela 1,10-fenantrolina também foi relatada (Zanetti *et al.*, 2002; Barbaro *et al.*, 2005).

Serinoproteases foram detectadas no veneno de *L. intermedia* por ensaios zimográficos mostrando dois sinais gelatinolíticos com massas moleculares elevadas (85 kDa e 95 kDa). A natureza bioquímica dessas proteases foi caracterizada pela inibição total da hidrólise da gelatina usando

inibidores distintos de serinoproteases, como aprotinina, benzamidina, leupeptina, flureto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e inibidor de tripsina de soja (Veiga *et al.*, 2000).

O veneno de *L. intermedia* foi investigado quanto à presença de toxinas inseticidas ativas contra *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidade), inseto que tem causado grandes reduções na produção de milho no Brasil. Uma combinação de filtração em gel (Sephadex G-100) e cromatografia de troca iônica (Carboximetil Celulose, CM 52) resultou em quatro frações principais que foram submetidas ao ensaio biológico. A fração 4 foi ainda purificada por HPLC de fase reversa (Coluna C18) resultando em peptídeos ativos contra *Spodoptera frugiperda*. Três novas toxinas potenciais inseticidas denominadas LiTx x 1, LiTx x 2 e LiTx x 3 foram identificadas. As sequências parciais do terminal amino desses peptídeos foram obtidas e usadas para clonar os DNA complementares (cDNA) correspondentes com a ajuda de oligonucleotídeos degenerados. A sequência de aminoácidos deduzida do cDNA de LiTx x 1, LiTx x 2 e LiTx x 3 revelou proteínas maduras de aproximadamente 7,4, 7,9 e 5,6 kDa (Castro *et al.*, 2004).

Trevisan-Silva *et al.* (2009) relataram a existência de uma família de toxinas metaloproteases do tipo astacina no veneno de *L. intermedia*, bem como no veneno de diferentes espécies de *Loxosceles*. Usando uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*, foram clonados dois novos cDNA que codificam toxinas metaloproteases do tipo astacina, LALP2 e LALP3. Utilizando um antissoro contra a toxina semelhante à astacina descrita anteriormente no veneno de *L. intermedia* (LALP1), foram detectadas toxinas imunologicamente relacionadas nos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Experimentos zimográficos mostraram atividade gelatinolítica dos venenos brutos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (que pode ser inibida pelo quelante de metal bivalente 1,10-fenantroline) em mobilidades eletroforéticas idênticas às relatadas para reatividade cruzada imunológica. Além disso, RNA mensageiro (mRNA) extraídos das glândulas de veneno de *L. laeta* e *L. gaucho* foram rastreados para metaloproteases do tipo astacina e cDNA obtidos usando primers específicos de LALP1 foram sequenciados, e suas sequências de aminoácidos deduzidas confirmaram que eram membros da família astacina com a família assinaturas (HEXXHXXGXXHE e MXY), LALP4 e LALP5, respectivamente. A comparação de sequências de aminoácidos deduzidas revelou que LALP2, LALP3, LALP4 e LALP5 estão relacionados à família astacina. Os autores cogitaram a possibilidade de que essas moléculas estejam envolvidas nos efeitos deletérios desencadeados pelo veneno.

A hialuronidase é a fração responsável pelo espalhamento gravitacional da lesão dermonecrotica característica no loxoscelismo, pois degrada a matriz extracelular causando hidrólise do tecido conjuntivo e degradação do ácido hialurônico (Silveira *et al.*, 2007). O papel das hialuronidases do veneno de *Loxosceles* como fatores de disseminação foi demonstrado quando se utilizou uma hialuronidase recombinante de *L. intermedia* (Ferrer *et al.*, 2013). A hialuronidase de Dietrich, como foi nomeada, foi expressa em células de *Escherichia coli* e submetida a redobramento *in vitro* para obter uma enzima marcada 6xHis solúvel e ativa com aproximadamente 45 kDa. Esta enzima recombinante reteve determinantes antigênicos lineares de hialuronidases nativas do veneno bruto de *Loxosceles* como demonstrado por imunoenaios. Por fim, a hialuronidase de Dietrich aumentou a área de dermonecrose e acentuou o edema induzido por uma fosfolipase D recombinante, bem como desencadeou a propagação gravitacional da lesão. Esses dados provaram o papel das hialuronidases de *Loxosceles* como um fator de disseminação de outras toxinas próximas ao local da picada (Ferrer *et al.*, 2013). Duas outras hialuronidases de aranha foram produzidas como toxinas recombinantes: CsHyal (de *Cuppienius salei*), que foi produzida em *E. coli* e redobrada posteriormente e BvHyal (de *Brachypelma vagans*), que foi expressa usando o sistema de baculovírus em células de insetos (Clement *et al.*, 2012; Biner *et al.*, 2015). CsHyal potencializou

a atividade inseticida de neurotoxinas em presas de invertebrados, e os autores especularam que esta glicosidase pode atuar como um fator de disseminação que aumenta a atividade de compostos neurotóxicos do veneno (Biner *et al.*, 2015).

Uma nova isoforma da hialuronidase do veneno de *L. intermedia* foi produzida em um sistema de células de insetos infectados por baculovírus e denominada LiHyal2 (Dantas *et al.*, 2016). Esta glicosidase recombinante foi produzida como uma enzima glicosilada ativa e a caracterização biológica de LiHyal2 confirmou sua capacidade de atuar como fator de disseminação.

3.3. Loxoscelismo

O veneno da *Loxosceles* provoca efeitos nocivos em mamíferos sendo utilizado com o objetivo de paralisar a presa e como mecanismo de defesa (Gremski *et al.*, 2014; Vetter, 2011). Esse veneno causa lesões celulares por meio de diversos mecanismos (Sitprija, 2008) e sua distribuição no organismo é determinada pela perfusão sanguínea e pela habilidade em atravessar o endotélio vascular e penetrar nas células (Sitprija e Sitprija, 2012; Sitprija e Boonpucknavig, 2014).

O mecanismo de ação do veneno não está totalmente elucidado, entretanto estudos demonstram que se trata de um processo multifatorial, que envolve a ação direta do veneno sobre os tecidos e a resposta do organismo à agressão causada pelo mesmo (Barbaro e Cardoso, 2003; Malaque *et al.*, 2016) e há um consenso de que as isoformas da fosfolipase D são as responsáveis pela patologia do envenenamento em mamíferos (Fingermann *et al.*, 2020).

A lesão dermonecrotica observada no loxoscelismo é decorrente de um processo complexo que inicialmente é caracterizado pelo efeito direto do veneno sobre as células, componentes da membrana celular, da membrana basal e matriz extracelular. A interação inicial entre o veneno e os tecidos ativa mecanismos endógenos tais como: o sistema complemento, migração e liberação de enzimas proteolíticas pelos polimorfonucleares (PMN), agregação plaquetária, liberação de diversas citocinas e quimiocinas, participação de enzimas hidrolíticas que contribuem para o aumento da lesão por meio de danos na microvascularização, perturbação no fluxo sanguíneo, indução de edema e ação isquêmica levando a uma degeneração celular e dano tecidual local (Barbaro e Cardoso, 2003). Apesar das fosfolipases-D serem consideradas o componente chave para o desenvolvimento da lesão dermonecrotica (Silva *et al.*, 2004; Malaque *et al.*, 2016) outras frações contribuem para as manifestações clínicas (Cordeiro *et al.*, 2015).

A síndrome clínica decorrente dos acidentes com as aranhas do gênero *Loxosceles* é denominada de loxoscelismo e possui duas apresentações clínicas distintas: cutâneo e cutâneo-visceral (Futrell, 1992; Silva *et al.*, 2004; Malaque *et al.*, 2016).

A apresentação clínica do loxoscelismo depende de vários fatores, como a quantidade inoculada de veneno, da espécie, sexo e do estágio de desenvolvimento da aranha, assim como da região anatômica afetada pela picada, da idade, estado de saúde, presença ou não de comorbidades e da resposta imune do paciente (Malaque *et al.*, 2016).

O loxoscelismo cutâneo é a apresentação clínica mais frequente, sendo observada no local da picada a presença de uma lesão que apresenta um curso relativamente lento, podendo progredir para a formação de uma necrose. A picada da *Loxosceles* normalmente é indolor, podendo passar despercebida num primeiro momento, ou levemente dolorida, sendo relatada como uma picada de agulha ou sensação de coceira, e a maioria das vítimas não percebem, pois os acidentes acontecem

durante o sono. Após um período de 2 a 6 horas após a picada, a intensidade da dor pode aumentar e ser acompanhada por edema e eritema no local. Nas primeiras 24 horas, a lesão característica do loxoscelismo pode evoluir com a formação de uma mácula dolorosa e irregular apresentando uma lesão em “placa marmórea”, por apresentar centro necrótico circundado por um anel isquêmico esbranquiçado em um fundo eritematoso (Malaque *et al.*, 2002; Malaque *et al.*, 2016). Essa lesão, no entanto, não é observada com frequência nos animais, já que dificilmente se forma o anel esbranquiçado (Silva *et al.*, 2004). A ferida evolui para uma úlcera geralmente dolorida e de difícil cicatrização (Isbister e White, 2004; Peterson, 2006).

As metaloproteases presentes no veneno, conhecidas por atuarem como fatores hemorrágicos (Feitosa *et al.*, 1998), causam degradação dos componentes da matriz celular e, em associação com as serinoproteases podem alterar a hemostasia (Feitosa *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2002). As metaloproteases, também atuam como um fator de espalhamento das demais toxinas presentes no veneno, já que agem sobre os componentes da matriz celular (Feitosa *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2002).

Após um período de sete a 10 dias, a lesão local vai se delimitando até formar uma crosta necrótica seca, escara necrótica com as bordas bem definidas (Barbaro e Cardoso, 2003; Malaque *et al.*, 2016), sendo incomum a presença de infecção secundária (Isbister e Fan, 2011). A crosta necrótica se desprende na segunda ou terceira semana, deixando uma úlcera com profundidade e extensão variáveis (Barbaro e Cardoso, 2003; Malaque *et al.*, 2016).

Não são todas as lesões que evoluem para necrose. Existem algumas variáveis que estão associadas a diversidade das lesões encontradas no loxoscelismo como: a quantidade de veneno inoculado, a espécie, sexo e estágio de desenvolvimento da aranha, além da resposta individual do paciente (Schenone *et al.*, 1989).

Os sinais clínicos cutâneos acontecem na maioria das vezes, sendo as toxinas presentes no veneno são as responsáveis por esses efeitos que variam desde eritema a áreas de necrose e ulceração em humanos e em modelos experimentais, como os coelhos (Martins *et al.*, 2022). Nos estudos realizados em coelhos foram observadas as mesmas lesões presentes nas biópsias de pele de humanos, área de dermonecrose com infiltrado de células inflamatórias na derme (Barbaro *et al.*, 1992; Ospedal *et al.*, 2002; Martins, 2014; Rodrigues, 2021; Martins *et al.*, 2022).

O loxoscelismo cutâneo-visceral é a forma mais grave sendo caracterizada por hemólise intravascular associada a lesão cutânea (Barbaro e Cardoso, 2003; Malaque *et al.*, 2016; Malaque *et al.*, 2017). Esta é a forma mais grave do loxoscelismo, pois a hemólise pode levar ao desenvolvimento de injúria renal aguda (IRA) e coagulação intravascular disseminada (CID) que são as principais causas de óbitos nessa apresentação (Futrell, 1992; Isbister e Fan, 2011; Malaque *et al.*, 2011).

A frequência do loxoscelismo cutâneo-visceral varia de acordo com a espécie de *Loxosceles* envolvida no acidente (Malaque *et al.*, 2016). Estudos realizados em áreas endêmicas de *L. laeta* mostraram uma taxa de 13 a 16% (Schenone *et al.*, 1989; Sezerino *et al.*, 1998) e uma frequência de 10% nas áreas com predomínio de *L. gaucho* (Malaque *et al.*, 2011), sendo raro nas áreas com predomínio de *L. reclusa* (Wright *et al.*, 1997) e muito raro em áreas endêmicas de *L. intermedia* e *L. rufescens* (Borkan *et al.*, 1995). Essa apresentação tem uma frequência alta em crianças (Sezerino *et al.*, 1998).

A hemólise pode ser aguda ou insidiosa, ocorrendo entre 48 e 96 horas após a picada. No entanto, os sinais clínicos de hemólise intravascular, como anemia, icterícia e hemoglobinúria geralmente ocorrem nas primeiras 24 horas após o acidente (Futrell, 1992). A presença de hemólise subclínica foi relatada em regiões onde a maioria dos acidentes são atribuídos a *L. gaucho* (Malaque *et al.*, 2011). Não existe correlação entre a gravidade da lesão local e a da hemólise (Malaque *et al.*, 2017), porém complicações como a injúria renal aguda (IRA) e a coagulação intravascular disseminada (CID) são observadas nos pacientes com hemólise intensa (Malaque *et al.*, 2011).

Em ambas as apresentações clínicas do loxoscelismo são observadas manifestações sistêmicas inespecíficas, como exantema papular e macular, eritema palmar e plantar, dor de cabeça, fraqueza, mal-estar, tontura, náuseas, vômitos e febre (Futrell, 1992; Malaque *et al.*, 2011). As manifestações sistêmicas são relativamente comuns, ocorrendo normalmente nas primeiras 48 horas após o acidente, e quando presente podem ajudar a estabelecer o diagnóstico de loxoscelismo (Malaque *et al.*, 2017).

3.4. Alterações hematológicas e medulares

Sabe-se que as alterações precoces nos parâmetros hematológicos são difíceis de serem relatadas em acidente envolvendo humanos e animais, já que a maioria dos pacientes é admitida para atendimento 48 horas após o acidente (Malaque *et al.*, 2002). Além disso, diferentes graus de toxicidade do veneno, já foram demonstrados experimentalmente para *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta*, podem influenciar a apresentação clínica e a gravidade do envenenamento (White *et al.*, 2008).

O veneno da *Loxosceles* pode causar hemólise intravascular, porém a patogênese, da forma mais grave, o loxoscelismo cutâneo-hemolítico, e as vias exatas da ação do veneno ainda não estão totalmente elucidadas. Acredita-se que haja o envolvimento de diversos mecanismos moleculares e/ou celulares, assim como vias patogênicas. Além das alterações ocasionadas pela ação da SMase D, o veneno tem um efeito direto hemolítico nas hemácias (Hogan *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004), pois essa enzima é capaz de ativar metaloproteases endógenas que clivam as glicoforinas da superfície das hemácias, fazendo com essas células sejam susceptíveis a lise pelo sistema complemento (Tambourgi *et al.*, 2000; Tambourgi *et al.*, 2007).

Futrell *et al.* (1979) descreveram um modelo para estudo da hemólise associada com o veneno da aranha marrom. Nesse modelo foi observado reação hemolítica em hemácias de humanos e suínos, mas em coelhos e em cobaias não houve hemólise, o que indica alguma variação na susceptibilidade animal. Silva *et al.* (2003) relataram que as hemácias de coelhos são resistentes à hemólise induzida pelo veneno de *Loxosceles spp.* pela ausência de glicoforina na superfície das hemácias dessa espécie, que são um alvo importante para os componentes hemolíticos do veneno. Entretanto, Barreto *et al.* (2007) observaram que o veneno de *L. gaucho*, apesar de não ocasionar hemólise em coelhos, foi capaz de modificar a função das hemácias devido a alteração na permeabilidade da membrana.

Martins (2014) observou que houve diminuição do hematócrito de coelhos, três dias após a inoculação do veneno da *L. laeta* e, seis dias após, independente do tratamento instituído, houve retorno à normalidade do hematócrito. Esses resultados mostram uma anemia discreta podendo ser decorrente da hemorragia observada macro e microscopicamente no local da ferida (Tavares *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2022). Tavares *et al.* (2004) não viram evidências de hemólise intravascular

em coelhos após o envenenamento experimental com *L. gaucho* confirmando os achados anteriores de uma possível maior susceptibilidade da espécie ao veneno.

Os PMN possuem um papel crítico nas lesões dermonecroticas e migram para o tecido lesado, com conseqüente alterações na celularidade da medula óssea e no sangue periférico. A diminuição dos PMN protege contra o processo patológico induzido pelo veneno, mas o veneno não causa a ativação direta desses PMN (Smith e Micks, 1970). Patel *et al.* (1994) confirmaram que o veneno ativa as células endoteliais que, por sua vez, ativam os PMN. Uma vez ativadas, as células endoteliais são as responsáveis pela lesão tecidual.

A observação do número de leucócitos na circulação sanguínea é variável e depende do tempo da coleta após o envenenamento, assim como a dose do veneno inoculada (Silva *et al.*, 2003, McGlasson *et al.*, 2007; Malaque *et al.*, 2011). Em um experimento com coelhos, Silva *et al.* (2003) relataram presença de leucopenia intensa, 24 horas após a administração do veneno de *L. intermedia*, com posterior recuperação cinco dias após o envenenamento. Já Tavares *et al.* (2004) relatam leucopenia nas primeiras 24 horas após o envenenamento seguida por leucocitose, que atingiu o pico com 72 horas.

Verificou-se que a leucopenia está relacionada a neutropenia, ambas observadas no mesmo período. Esse fato ocorre devido a migração intensa de neutrófilos para o tecido, horas após o acidente, ocasionando um decréscimo transitório de leucócitos na circulação sanguínea (Tavares *et al.*, 2004). McGlasson *et al.* (2007) observaram resultados semelhantes 24 horas após a inoculação de 4 e 10µg do veneno da *L. reclusa* em coelhos. Entretanto, verificou-se leucocitose intensa e estatisticamente significativa 72 horas após a inoculação.

O loxoscelismo também pode causar leucocitose, mesmo em ausência de processo infeccioso. Embora o mecanismo da leucocitose induzida pelo veneno não seja completamente compreendido, acredita-se que a leucocitose seja devido ao efeito da fosfolipase D, que induz uma quimiotaxia de neutrófilos (Gremski *et al.*, 2014).

A avaliação do número plaquetário nos pacientes acometidos pelo loxoscelismo é muito importante, já que a coagulação intravascular é um achado constante nessa síndrome (Elston *et al.* 2000). A trombocitopenia ocorre de uma forma precoce nos acidentes por *Loxosceles* sp., devido ao consumo intenso durante a hemorragia no local da picada (Silva *et al.*, 2003). Valores mínimos de plaquetas foram observados 24 horas após o envenenamento (Pauli *et al.*, 2009), com reestabelecimento da normalidade cerca de 24 horas após. A trombocitopenia é tida um evento precoce e transitório (Tavares *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2009).

O envolvimento de plaquetas no loxoscelismo foi observado em cães que apresentaram trombocitopenia após administração intravenosa do veneno de *L. reclusa* (Denny *et al.*, 1964). Fato também observado por Branco *et al.* (2014) em um cão com diagnóstico presuntivo de loxoscelismo cutâneo-visceral.

O veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* promove agregação plaquetária e trombocitopenia, que é causada pela esfingomielinase D (Kurpiewski *et al.*, 1981), como evidenciado em estudos com venenos de *L. reclusa*, *L. intermedia* e *L. laeta* que indicam que a trombose capilar é um evento precoce seguido por um influxo de leucócitos (Elston *et al.* 2000) e coagulação intravascular no local da picada (Futrell, 1992).

Os mecanismos que levam a distúrbios sistêmicos no loxoscelismo podem envolver alterações na regulação de citocinas pró-inflamatórias e na coagulação, o que pode criar um ambiente hipercoagulável. O veneno também tem um efeito direto prejudicial nas membranas endoteliais na parede do vaso sanguíneo, propiciando a deposição de fibrina e a formação de trombos dentro dos vasos sanguíneos (Zanetti *et al.*, 2002).

O estudo de Tavares *et al.* (2004) mostrou que os coelhos apresentam um *status* pró-coagulante progressivo com trombocitose, hiper agregação plaquetária, hiperfibrinogenemia e aumento na concentração plasmática dos fatores de coagulação 72 e 120 horas após a inoculação do veneno da *L. gaucho*. Nessas condições, um eventual processo hemolítico poderia desencadear uma ativação hemostática levando a um quadro de coagulação intravascular disseminada (CID). Uma vez que ausência de hemólise e CID, nesse estudo, consiste com a hipótese de que há uma conexão entre esses dois eventos no loxoscelismo cutâneo-hemolítico.

Silva *et al.* (2003) estudaram os efeitos do veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* sobre a celularidade da medula óssea e do sangue periférico após o envenenamento. O objetivo principal dessa pesquisa foi determinar se o veneno tem efeito direto na medula óssea e no sangue periférico ou se as alterações observadas são secundárias as demandas teciduais. A diminuição dos megacariócitos foi correlacionada com a trombocitopenia periférica nos tempos 4 e 12 horas, porém após um período de 24 a 48 horas foi observado um aumento na contagem dos megacariócitos e plaquetas. Esses valores foram normalizados após cinco dias do envenenamento. A trombocitopenia pode ser consequência do extensivo consumo das plaquetas no local da picada ou da ação direta do veneno levando à consequente depressão dos megacariócitos, porém essa ação teria um efeito transitório, já que houve a normalização dos valores dentro de cinco dias. Essa depressão tem correlação com as alterações observadas nas biópsias de pele realizadas em coelhos

A neutropenia periférica é uma consequência da diapedese dos neutrófilos para o tecido, associada à uma não resposta ou esgotamento medular (Silva *et al.*, 2003). A hipótese de que o veneno de *Loxosceles* é um agonista endotelial e que as células endoteliais ativadas são responsáveis pela ativação dos PMN foi testada por Patel *et al.* (1994).

Da mesma forma, a trombocitopenia periférica pode ser consequência da migração extensiva de plaquetas para a lesão dermonecrotica e formação de trombos ou devido a uma depressão medular transitória causada pelo veneno da *L. intermedia* (Silva *et al.*, 2003).

Em relação ao eritrograma, Silva (2005) não observou alteração nos parâmetros eritrocitários no sangue periférico, porém descreveu que houve uma diminuição significativa da concentração dos eritroblastos na medula óssea. Foi levantada a hipótese de que essa diminuição medular fosse devido a um efeito mitogênico, ocasionando uma maior diferenciação dos eritroblastos para a manutenção da série vermelha no sangue periférico ou uma possível ação direta do veneno sobre os eritroblastos.

3.5. Diagnóstico

O diagnóstico do loxoscelismo raramente é baseado na identificação da aranha, pois essa não costuma ser levada no momento da avaliação do paciente. Diante disso, é baseado em achados clínicos e epidemiológicos, por meio dos sinais e sintomas clínicos (Wright *et al.*, 1997; Vetter, 1999) e exclusão de outras patologias (Sezerino *et al.*, 1998).

Não há na rotina clínica nenhum teste disponível para diagnóstico desses acidentes (Malaque *et al.*, 2016), porém o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi usado experimentalmente para detectar o veneno de lesões e soro ou anticorpos circulantes do veneno, mas seu uso não é utilizado rotineiramente na clínica (Silva *et al.*, 2004; Hogan *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2014).

3.6. Tratamento

Ainda não há um consenso sobre a melhor terapia para o tratamento das feridas dermonecroticas decorrentes do loxoscelismo. Diversas terapias já foram avaliadas em estudos experimentais, porém os dados são divergentes e poucas conclusões podem ser feitas quanto a melhor terapia, principalmente para a melhor resolução da ferida dermonecrotica (Maynor *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2004; Swanson e Vetter, 2005).

Apesar do soro antiloxoscélico ser o único tratamento específico para neutralizar a ação do veneno (Brasil, 2001), o seu uso não está disponível na medicina veterinária (Collacico *et al.*, 2008), e as opiniões são divergentes quanto à sua eficácia em neutralizar os efeitos locais do veneno (Pauli *et al.*, 2009). Portanto, a terapia é baseada nos sinais clínicos observados, sendo utilizado tratamento de suporte, analgesia e limpeza da ferida associada ao uso de antibióticos sistêmicos (Malaque *et al.*, 2002). Mas, várias outras terapias são reportadas: oxigênio hiperbárico (Phillips *et al.*, 1995; Maynor *et al.*, 1997), anti-histamínicos (Phillips *et al.*, 1995), excisão cirúrgica da ferida, corticoides (Rees *et al.*, 1985), dapsona (Rees *et al.*, 1985; Barret *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1995; Elston *et al.*, 2005; Martins, 2014) e células tronco mesenquimais (Rodrigues, 2021; Martins *et al.*, 2022).

3.6.1. Células tronco mesenquimais e secretoma

As células tronco (CT) são células indiferenciadas que apresentam alta capacidade de proliferação, autorrenovação, diferenciação em linhas celulares especializadas e regeneração de tecidos. Essa capacidade é dependente da sua origem e potencialidade, podendo ser isoladas e caracterizadas a partir de tecidos embrionários fetais ou adultos (Sanders *et al.*, 2006; Zakrzewski *et al.*, 2019). Como possuem propriedades com grande potencial terapêutico, vem sendo utilizadas em diversos contextos clínicos (Chamberlain *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2010; Fierabracci *et al.*, 2016; Bari *et al.*, 2018).

De acordo com o seu potencial de diferenciação são classificadas em célula-tronco totipotentes, que tem a capacidade de formar um organismo inteiro; pluripotentes, capazes de formar células de todas as camadas germinativas, mas não de estruturas extraembrionárias; multipotentes, que formam linhagens celulares mais específicas; oligopotentes, que se diferenciam em vários tipos celulares; e unipotentes, capazes de formar apenas um tipo celular (Zakrzewski *et al.*, 2019).

As células tronco mesenquimais (CTM) são CT adultas e não apresentam restrições éticas em sua utilização, sendo mais bem caracterizadas e estudadas, tornando-se uma opção na medicina regenerativa. A principal desvantagem das CTM é a sua característica de multipotência, não sendo capazes de originar células de todos os folhetos embrionários (Barreto Filho e Oliveira, 2012). As CTM são extraídas da medula óssea, mas células com características semelhantes foram isoladas de diversos tecidos: adiposo (Zuk *et al.*, 2001), pele (Toma *et al.*, 2001), membranas fetais (Bailo *et al.*, 2004) e líquido amniótico (De Coppi *et al.*, 2007).

As CTM possuem capacidade de se diferenciar em várias células da linhagem mesenquimal, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos e mioblastos (Kim *et al.*, 2017) e são uma

população heterogênea de células que apresentam expressão variável de marcadores dependendo da origem do tecido, método de isolamento e cultura, por isso a expressão de marcadores *in vitro* pode nem sempre refletir os padrões de expressão *in vivo* (Chamberlain *et al.*, 2007).

Com o intuito de caracterizar a população celular, a Sociedade Internacional para Terapia Celular definiu critérios mínimos para a classificação das CTM (Dominici *et al.*, 2006): aderência a superfície plástica, multipotência *in vitro* (capacidade de diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos em condições adequadas), padrão de expressão de marcadores de superfície celular de CD105, CD73 e CD90 para mais de 95% da população celular e expressão menor que 2% ou ausência de expressão dos marcadores de superfície celular CD45, CD34, CD14, CD11b CD79a, CD19 e HLADR classe II (Dominici *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017).

O potencial terapêutico das CTM pode ser atribuído aos seguintes mecanismos-chave de ação: 1) *homing*, que é uma característica distinta dessas células em comparação com a maioria dos outros tipos celulares pela qual as CT administradas por via sistêmica migram para o foco da lesão devido a sinalizações químicas (Vizoso *et al.*, 2017), sendo esta característica a base para que as CT possam atingir os sítios alterados após a administração endovenosa, intra-lesional ou peri-lesional (Baglio *et al.*, 2012). As citocinas liberadas nos sítios de inflamação ou lesão promovem a sinalização química para orientar a migração das células implantadas (Dahlgren, 2009); 2) diferenciação em múltiplos tipos celulares, enxertando-se localmente e induzindo a restauração da função tecidual (Deans e Moseley, 2000; Jiang *et al.*, 2006); 3) secreção de fatores bioativos que podem afetar potencialmente os processos fisiológicos locais e sistêmicos (Gnecchi *et al.*, 2008).

As CTM podem ser utilizadas através de implante local, no caso de doenças localizadas, como feridas cutâneas; transplantes sistêmicos em associação à terapia gênica, e ainda a sua utilização em protocolos de engenharia celular (Chamberlain *et al.*, 2007). Nas últimas duas décadas, muito progresso foi feito no delineamento dos mecanismos moleculares de ação das CTM e sua potencial aplicação na terapia regenerativa para um amplo espectro de doenças, incluindo várias doenças autoimunes e inflamatórias (Li *et al.*, 2021).

O fato de as CTM manterem a capacidade de se diferenciar em linhagens celulares especializadas *in vitro*, apresentarem relativa facilidade de obtenção e expansão em cultura, baixo risco imunogênico e tumorigênico, além de serem naturalmente recrutadas pelo organismo para reparar tecidos danificados (Elisseff *et al.*, 2005) fazem das CTM uma fonte promissora de CT para a medicina regenerativa e terapia gênica (Chamberlain *et al.*, 2007). As terapias celulares que usam CTM têm a flexibilidade de serem aplicadas de forma autólogas, a partir de amostras do próprio paciente, ou alogênicas, a partir de um banco de células (Elisseff *et al.*, 2005). No entanto, estudos demonstram que, de modo geral, as CTM apresentam baixa sobrevida no ambiente lesionado após a sua inoculação. Desta forma, acredita-se que a sinalização parácrina seja o provável mecanismo de atuação das CTM no reparo tecidual, atuando pela alteração do microambiente a partir da secreção de fatores tróficos.

Gnecchi *et al.* (2005) demonstraram que as CTM mediam seus efeitos terapêuticos pela liberação de fatores parácrinos, conhecidos como secretoma, que é descrito por uma mistura complexa de produtos solúveis, composto por uma fração proteica, constituída de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e por microvesículas insolúveis, conhecidas como vesículas extracelulares (Crivelli *et al.*, 2017), que possui um grande potencial terapêutico (Bari *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2020). As moléculas secretadas estão envolvidas em diversos processos biológicos que incluem recrutamento de células vizinhas, morte celular, proliferação, hematopoiese, angiogênese,

propriedades imunomoduladoras e organogênese (Chamberlain *et al.*, 2007). Teixeira *et al.* (2013) observaram que o secretoma é o principal responsável pelo reparo tecidual mediado pelas CTM.

A utilização do secretoma tem vantagens em relação ao transplante de células, como a sobrevivência das células após o transplante, menor expressão antigênica quando comparado com o uso de células vivas proliferativas, economia e praticidade para as aplicações clínicas, evitando a coleta por meio de procedimentos invasivos, além da segurança pois os ensaios clínicos realizados até o momento, demonstram eficácia e ausência de feitos adversos (Vizoso *et al.*, 2017).

Estudos recentes realizados por Rodrigues (2021) e Sanchez-Castro *et al.* (2021) avaliaram a eficácia do secretoma como agente terapêutico no loxoscelismo e envenenamento botrópico, respectivamente. Rodrigues (2021) observou que o secretoma tem um potencial terapêutico, quando utilizado por via endovenosa, devido à redução da inflamação aguda local, além da ativação de fibroblastos, desenvolvimento precoce de tecido conjuntivo, neovascularização e reepitelização tecidual. Sanchez-Castro *et al.* (2021) observaram a redução da mionecrose, o que favoreceu uma resposta regenerativa bem-sucedida.

Nesse sentido, a possibilidade de combinar imunoterapia com antivenenos e a terapia celular com capacidade anti-inflamatória potente, aparece como uma real possibilidade aos problemas de envenenamento por *Loxosceles*.

4. Medula óssea

O tecido da medula óssea fornece microambientes complexos para o suporte estrutural e nutricional essencial para a diferenciação ordenada, proliferação, maturação e liberação de células sanguíneas em desenvolvimento. A principal função da medula óssea é a produção de todos os tipos de células sanguíneas a partir de células-tronco primitivas em mamíferos adultos. A medula óssea responde de forma sensível ao aumento da demanda de células do sangue periférico por meio de fatores de crescimento hematopoiéticos e alterações em seu microambiente (Stacy e Harvey, 2017).

A medula óssea é um local de intensa multiplicação e maturação celular e a sua avaliação é indicada quando estão presentes anormalidades nas células do sangue periférico que não podem ser explicadas no contexto da história clínica, exame físico ou por outros métodos adicionais, como por exemplo pancitopenia, anemia arregenerativa, trombocitopenia e leucopenia persistentes, estadiamento de linfoma etc. (Harvey, 2012; Thrall e Weiser, 2012; Stacy e Harvey, 2017), além de ter importância nos estudos de avaliação de toxicidade ou segurança (Travlos, 2006).

A abordagem sistemática para avaliação do mielograma é a base para a interpretação completa e precisa dos achados citológicos qualitativos e semiquantitativos da medula óssea. A identificação adequada das células é crucial para a avaliação citológica (Stacy e Harvey, 2017).

Os precursores eritróides, quando comparados com a série granulocítica, são menores, tendem a apresentar núcleos arredondados, cromatina grosseira e citoplasma de coloração azulada que se torna rósea à medida que as células mais diferenciadas sintetizam hemoglobina (Harvey, 2012; Thrall e Weiser, 2012; Stacy e Harvey, 2017). Quando a maturação celular é ordenada, o núcleo é extrusado antes que as células estejam totalmente maduras, resultando na formação de um reticulócito (Stacy e Harvey, 2017). Os estágios de desenvolvimento da série eritróide, de células imaturas a maduras, incluem rubriblasto, prorrubricito, rubricito, metarrubricito, eritrócito policromatofílico e eritrócito maduro (Thrall e Weiser, 2012).

Os precursores granulocíticos (mieloides) tendem a apresentar o núcleo com formato irregular e, às vezes excêntrico, com cromatina muito fina, pontilhada e abundante citoplasma de coloração violeta. À medida que a célula amadurece, o núcleo alonga-se e torna-se arredondado a reniforme ou de formato de ferradura a segmentado. Os estágios de maturação dessa série, de células imaturas a maduras, incluem mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, neutrófilo bastonete e neutrófilo segmentado (Thrall e Weiser, 2012).

As células da série megacariocítica são grandes e seus fragmentos citoplasmáticos tornam-se as plaquetas, importantes no mecanismo de coagulação. Os estágios de maturação, de célula imatura a madura, são megacarioblasto, promegacariócito e megacariócito (Thrall e Weiser, 2012).

A linhagem de células monocítica é responsável por uma baixa porcentagem de células, cerca de 2% de todas as células nucleadas (Stacy e Harvey, 2017), mas apresentam como característica distinta o núcleo com contorno irregular (Thrall e Weiser, 2012).

Como a medula óssea é um órgão linfoide, os linfócitos também se desenvolvem nesse tecido complexo. Uma pequena quantidade de linfoblastos e prolinfócitos, além de uma quantidade variável de linfócitos maduros estão presentes na medula óssea normal. Os plasmócitos apresentam um único núcleo esférico frequentemente posicionado excentricamente, uma zona de Golgi perinuclear e citoplasma basofílico (Stacy e Harvey, 2017).

Os osteoclastos são células grandes multinucleadas, porém com núcleos individuais e apresentam citoplasma basofílico, podendo conter alguns grânulos róseos ou azurofílicos, enquanto os osteoblastos contêm núcleos excêntricos arredondados ou ovais e apresentam abundante citoplasma basofílico e uma zona de Golgi clara (Harvey, 2012; Thrall e Weiser, 2012; Stacy e Harvey, 2017).

A avaliação do mielograma, assim como a sua interpretação, deve ser realizada em associação com o resultado do hemograma que é essencial para a interpretação adequada da razão mieloide:eritroide na avaliação da celularidade (Harvey, 2012).

A hematotoxicologia avalia os efeitos adversos de substâncias nocivas as células sanguíneas e de seus precursores. A hematotoxicidade é considerada primária, quando um ou mais componentes do sangue são afetados diretamente, ou secundária, quando o efeito tóxico é consequência de outra lesão tecidual ou distúrbios sistêmicos (Bloom *et al.*, 2013).

A avaliação histológica da medula óssea fornece informações importantes sobre o sistema hematopoiético e os efeitos relacionados à toxicidade causada por drogas ou produtos químicos (Travlos, 2006), assim como as alterações decorrente de envenenamentos (Silva *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2007) e na detecção de produtos químicos tóxicos nas investigações toxicológicas na medicina veterinária forense (Marcelino *et al.* 2020).

Como a espécie cunícula é comumente utilizada como modelo experimental nas pesquisas, a avaliação do mielograma é um componente importante nos estudos de toxicidade após exposição química. A avaliação precisa da medula óssea nessa situação depende da disponibilidade de dados referente ao mielograma de animais saudáveis (Riedel *et al.*, 2017).

A literatura é escassa com relação aos valores de normalidade para o mielograma da espécie cunícula. Há dois trabalhos que avaliam a composição e morfologia celular da medula óssea de

coelhos realizados por Dikoninova (1957) e Riedel *et al.* (2017), porém em animais com idade entre quatro e seis meses e três a seis meses, respectivamente.

5. Material e Métodos

O presente estudo foi realizado após a submissão e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo CEUA nº 131/2020. O estudo foi conduzido atendendo aos princípios éticos, respeitando o bem-estar e minimizando o desconforto dos animais.

5.1. Animais

Foram utilizados 16 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia, machos, adultos com peso médio de 2 kg provenientes da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), no município de Igarapé (MG).

Os animais foram mantidos no Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal (LAMACA) da EV-UFMG em gaiolas metálicas individuais com dimensões de 75 cm de comprimento x 30 cm de largura x 30 cm de altura. Água, feno e ração comercial foram oferecidas *ad libitum*.

5.2. Obtenção do veneno e secretoma de células-tronco mesenquimais

O *pool* de veneno proveniente da espécie *Loxosceles intermedia* foi obtido do Laboratório de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), gentilmente cedido pelo Prof. Carlos Delfin Chávez-Olórtegui.

O secretoma, também proveniente do Laboratório de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), é um produto liofilizado gerado de células-tronco mesenquimais (CTM), cultivado na ausência de soro fetal bovino, com concentração proteica de 0,57 mg/mL.

5.3. Grupos e procedimentos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (G) experimentais (n=4) e receberam identificação, de I a IV, na face interna das orelhas. Foi estabelecido um período de adaptação de sete dias para que esses animais pudessem se aclimatar ao novo ambiente.

Para manuseio dos animais foi realizado contenção manual com auxílio de um cobertor. Foi realizado tricotomia na região interescapular para a aplicação do veneno e/ou secretoma, assim como na face dorsal das orelhas, para a realização da aplicação do secretoma e coleta de sangue. Antes da realização de cada tratamento instituído e das coletadas de sangue foi realizada a antisepsia local com PVPI degermante¹ e álcool 70%².

A primeira coleta de sangue para a realização do hemograma foi realizada em todos os animais 24 horas antes do início do experimento, por meio de cateterização da artéria auricular, com auxílio

¹ Iodopolividona 10% (solução com tensoativos) – Riodeine Dermo Suave Degermante, Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto (SP), Brasil.

² Álcool etílico hidratado Tupi 70° INPM, Callamarys Indústria e Comércio de Cosméticos e Saneantes Ltda, Ibaté (SP), Brasil.

de um cateter 22G³. Foram coletados 3 mL de sangue, sendo 1,5 mL acondicionado em tubo anticoagulante ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) K₃ a 15%⁴ para a realização do hemograma.

O secretoma (60 µg) e o veneno da aranha *L. intermedia* (10 µg) foram diluídos em tampão fosfato-salino (PBS) a 0,5% e em seguida administrado por via intradérmica (ID) na região interescapular. O tratamento foi instituído após 30 minutos da inoculação do veneno, sendo que os grupos I e II receberam solução de cloreto de sódio 0,9%⁵ por via ID, e os grupos III e IV, receberam secretoma, por via intradérmica (ID) e endovenosa (EV), respectivamente. O Quadro 1 demonstra os grupos experimentais, desafios e tratamentos instituídos.

Quadro 1: Identificação dos grupos experimentais, desafios e tratamentos instituídos

Grupo	Desafio	Tratamento
I	NaCl 0,9%	Secretoma (ID)
II	Veneno (10 µg <i>L. intermedia</i> diluído em PBS 0,5%) - ID	NaCl 0,9% (ID)
III	Veneno (10 µg <i>L. intermedia</i> diluído em PBS 0,5%) - ID	Secretoma (ID)
IV	Veneno (10 µg <i>L. intermedia</i> diluído em PBS 0,5%) - ID	Secretoma (EV)

A aplicação do secretoma por via ID, nos grupos I e III, foi realizada em pontos equidistantes na região interescapular. Já a aplicação por via EV foi realizada na veia auricular marginal lateral.

Os animais foram observados diariamente por um período de 15 dias após a realização dos desafios, medidos edema e halo hemorrágico com paquímetro (as 6h, terceiro, nono e 15º dia), e as coletas de sangue foram realizadas antes (Tempo 0) e após a inoculação de veneno no terceiro, nono e 15º dia.

No 15º dia do experimento, os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento anestésico com propofol⁶ (>10 mg/kg) e cloreto de potássio⁷ (1 mL/kg), seguida da coleta da medula óssea.

5.4. Análises Laboratoriais

As amostras de sangue acondicionadas em microtubo com EDTA 10% foram utilizadas para realização de exames hematológicos em equipamento hematológico veterinário⁸. As amostras foram processadas em um período máximo de 30 minutos após a coleta. Foram determinados concentração total de hemácias (RBC), leucócitos e plaquetas, hematócrito (HT) e de hemoglobina (HB) e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Foram confeccionados esfregaços sanguíneos para contagem celular diferencial, fixando-se a lâmina com metanol, por cinco minutos, seguido da coloração tipo Romanowsky (panótico rápido⁹).

A medula óssea foi coletada do fêmur após sua exposição e os esfregaços foram realizados utilizando a técnica de pincel descrita por Bolliger (2004) e Riedel *et al.* (2017). Essa técnica consiste em

³ Catéter intravenoso BD Insyte™, Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Vacutube EDTA.K3 a 10%, Biocon® Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Cloreto de sódio a 0,9%, Fresenius Kabi Brasil Ltda, Barueri (SP), Brasil

⁶ Provive 1% - Propofol 10 mg/mL, Claris Produtos Farmacêuticos do Brasil Ltda., Barueri (SP), Brasil.

⁷ Solução de Cloreto de Potássio 19,1%, Isofarma® Indústria Farmacêutica Ltda., Eusébio (CE), Brasil.

⁸ Analisador hematológico veterinário Sysmex Poch-100iv Diff®, Sysmex do Brasil Ltda, Paraná.

⁹ Laborclin®, Curitiba, Brasil

utilizar um pincel pequeno, umedecido em albumina de soro bovino, para coletar e espalhar a medula em lâminas de vidro. A medula é “pintada” em todo o comprimento da lâmina usando de três a cinco movimentos suaves. As lâminas são deixadas para secar ao ar, sendo posteriormente coradas com panótico rápido. Os esfregaços obtidos por essa técnica têm a vantagem de ter áreas finas e grossas que contêm partículas inteiras de medula óssea. As partículas facilitam a avaliação da celularidade da medula e do teor de gordura. A determinação dos precursores eritróides, mielóides e megacariócitos foram realizadas em contagem celular em no mínimo 1500 células.

5.5. Estatística

As características estão descritas como média e desvio-padrão para aquelas em que foi realizada análise de variância. Já para as características avaliadas por meio de testes não-paramétricos, foram obtidos a mediana e os valores mínimo e máximo. Para as variáveis cujos resíduos apresentaram distribuição normal, os efeitos de grupo e tempo foram avaliados por meio do ajuste de um modelo misto em que o efeito do animal foi considerado como aleatório para acomodação das medidas repetidas ao longo do tempo. A comparação de médias foi realizada por meio do teste de Tukey. Para as variáveis que não cumpriram as premissas da análise de variância, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para comparação de grupos para cada tempo de análise e o teste de Skillings-Mack seguido do teste de Durbin para comparação de tempos em cada grupo experimental. Foi considerado em todas os testes de hipótese o nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas por meio do software R 4.0.2 (R Core Team, 2020).

6. Resultados e Discussão

6.1. Avaliação hematológica

6.1.1. Eritrograma

Na avaliação do eritrograma, no tempo zero, ou seja, antes da administração do veneno de *L. intermedia*, o número de hemácias, a concentração de hemoglobina e o hematócrito estavam menores ($p < 0,05$) nos animais dos grupos III e IV quando comparados com os animais dos grupos I e II (tabelas 1, 2 e 3). Contudo, salienta-se que esses índices se mantiveram dentro do intervalo de referência para a espécie cunícula, e essas alterações não possuem significado clínico. Isso acontece quando o coeficiente de variação é muito pequeno, pois o número de hemácias variou de $6,03$ a $6,96 \times 10^6 / \mu\text{L}$ de sangue.

Entretanto, após os desafios, independente se NaCl a 0,9% ou veneno de *L. intermedia*, houve diminuição na contagem do número de hemácias em todos os tempos (3, 9 e 15) conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios \pm desvio padrão da contagem de hemácias ($10^6/\mu\text{L}$) de coelhos antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9% e secretoma por via intradérmica e endovenosa

	Tempo (dias)	Grupos			
		GI	GII	GIII	GIV
Hemácias	0	$6,64 \pm 0,39^{\text{Aa}}$	$6,96 \pm 0,84^{\text{Aa}}$	$6,03 \pm 0,57^{\text{Ba}}$	$6,05 \pm 0,32^{\text{Ba}}$
	3	$5,91 \pm 0,41^{\text{Ab}}$	$6,25 \pm 0,38^{\text{Ab}}$	$4,59 \pm 0,54^{\text{Bb}}$	$4,54 \pm 0,31^{\text{Bb}}$
	9	$5,97 \pm 0,22^{\text{Ab}}$	$6,68 \pm 0,69^{\text{Ab}}$	$5,16 \pm 0,24^{\text{Bb}}$	$4,80 \pm 0,38^{\text{Bb}}$
	15	$6,07 \pm 0,40^{\text{Ab}}$	$6,04 \pm 0,16^{\text{Ab}}$	$5,47 \pm 0,16^{\text{Bb}}$	$5,09 \pm 0,46^{\text{Bb}}$

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas linhas e colunas, respectivamente. $p < 0,05$.

*Valores de referência segundo Fisher e Graham (2018): $4-8 \times 10^6/\mu\text{L}$.

Todavia, quando se compara os animais do GII, com os animais do GIII e GI, no tempo 3, observa-se que nesses dois grupos houve uma diminuição de mais de 20%. Apesar de discreto aumento percentual nos tempos seguintes, esses ficam significativamente menores (tempos 9 e 15), nos grupos III e IV.

Salienta-se que, as hemácias da espécie cunícula são mais resistentes à hemólise induzida pelo veneno de *Loxosceles* (Futrell, 1992; Silva *et al.*, 2003; Tavares *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2009; Martins, 2014) em contraste com as hemácias da espécie humana que são mais sensíveis a ação do veneno. A resistência à hemólise pode ser atribuída à ausência de glicoforinas nas superfícies dos eritrócitos dos coelhos (Tavares *et al.*, 2004).

A concentração de esfingomielina na membrana dos eritrócitos também está relacionada com os processos hemolíticos. Os eritrócitos humanos apresentam uma maior concentração de esfingomielina em sua superfície quando comparado com os da espécie cunícula, tornando-os mais susceptíveis a ação da esfingomielinase-D, que é a toxina mais importante presente no veneno loxoscélico (Barretto *et al.*, 2007).

O veneno da *L. gauchoi*, apesar de não provocar hemólise na espécie cunícula, foi capaz de modificar a função dos eritrócitos devido a alteração de permeabilidade na membrana (Barreto *et al.*, 2007). As alterações precoces nos parâmetros hematológicos tendem a ser difíceis de serem observadas em acidentes envolvendo humanos e algumas espécies animais, pois a maior parte dos pacientes é admitida para atendimento 48 horas após o acidente (Malaque *et al.*, 2002).

Apesar de o número de hemácias continuar dentro dos limites de referências para a espécie cunícula, de acordo do Fisher e Graham (2018), pode-se inferir que o secretoma contribuiu de forma negativa, diminuindo o número de hemácias, independente da via de administração. Não se sabe qual o mecanismo de ação, mas, também foi possível observar uma menor média do número de hemácias no grupo IV, que recebeu o secretoma via EV, mostrando uma maior ação sistêmica do secretoma.

A hemoglobina, no tempo zero (valor basal) mostrou padrão de comportamento semelhante ao das hemácias, com uma menor concentração nos grupos III e IV. Quando se faz uma análise temporal, observa-se que, nos grupos I e II, não houve alteração dessa variável. Contudo, nos grupos III e IV (grupos desafiados com veneno de *L. intermedia* e tratados com secretoma), a hemoglobina aumentou significativamente ($p < 0,05$), passando de 8,85 a 11,27 g/dL (Tabela 2). No 15º dia, todos os grupos, apresentam valores de hemoglobina semelhantes ($p < 0,05$). Também é importante salientar que esse analito se manteve dentro do intervalo de referência para a espécie cunícula de acordo com Fisher e Graham (2018).

Tabela 2: Valores médios \pm desvio padrão da concentração de hemoglobina (g/dL) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9% e secretoma via intradérmica e endovenosa

	TEMPO (dias)	GRUPOS			
		GI	GII	GIII	GIV
Hemoglobina	0	12,60 \pm 0,92 ^{Aa}	13,26 \pm 1,53 ^{Aa}	9,35 \pm 0,86 ^{Ba}	8,85 \pm 0,17 ^{Bc}
	3	11,32 \pm 0,90 ^{Aa}	11,90 \pm 0,73 ^{Aa}	9,42 \pm 1,01 ^{Ba}	9,70 \pm 0,86 ^{Bbc}
	9	11,62 \pm 0,69 ^{ABa}	12,37 \pm 0,93 ^{Aa}	11,33 \pm 0,73 ^{ABb}	10,67 \pm 0,41 ^{Bab}
	15	11,90 \pm 0,59 ^{Aa}	11,75 \pm 0,26 ^{Aa}	11,80 \pm 0,49 ^{Ab}	11,27 \pm 0,70 ^{Aa}

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas linhas e colunas, respectivamente. $p < 0,05$.

*Valores de referência segundo Fisher e Graham (2018): 8-17,5g/dL

Em relação ao hematócrito, não houve interação entre tempo e tratamento, e os valores também se mantiveram dentro dos limites de referência para a espécie (Tabela 3). O mesmo comportamento (descrito anteriormente para hemácias e hemoglobina) é observado nos grupos II e IV.

Tabela 3: Valores médios \pm desvio padrão de hematócrito (%) antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa

	TEMPO (dias)	GRUPOS			
		GI	GII	GIII	GIV
Hematócrito	0	41,85 \pm 3,15 ^A	43,33 \pm 5,36 ^A	38,57 \pm 2,67 ^B	38,92 \pm 1,92 ^B
	3	36,30 \pm 2,96 ^A	38,25 \pm 2,55 ^A	30,07 \pm 3,05 ^B	30,40 \pm 2,35 ^B
	9	37,17 \pm 1,71 ^A	39,37 \pm 3,10 ^A	35,50 \pm 2,57 ^B	33,30 \pm 1,89 ^B
	15	38,35 \pm 1,69 ^A	35,95 \pm 3,24 ^A	37,05 \pm 1,48 ^B	35,15 \pm 1,74 ^B

Letras maiúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas linhas. $p < 0,05$.

* Valores de referência segundo Fisher e Graham (2018): 30 a 50%.

Os índices hematimétricos, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) são utilizados para a caracterização da anemia. A tabela 4 mostra que os grupos III e IV, apesar de estatisticamente semelhantes aos outros grupos e tempos, apresentam valores abaixo do limite inferior de normalidade. Entretanto, três dias após o desafio, esses valores estão dentro do limite de normalidade. Sabe-se que o veneno loxoscélico pode causar hemólise intravascular, por ação direta na membrana celular das hemácias e por mecanismos ainda desconhecidos, fato não observado nesse experimento.

Tabela 4: Valores médios \pm desvio padrão de CHGM (g/dL) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), secretoma via intradérmica (GIII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15º dia após desafio e tratamentos

	TEMPO (dias)	GRUPOS			
		GI	GII	GIII	GIV
CHGM	0	30,10 \pm 0,14	32,13 \pm 2,51	24,25 \pm 1,65	22,77 \pm 0,80
	3	31,22 \pm 0,18	31,12 \pm 0,09	31,30 \pm 0,74	31,95 \pm 0,54
	9	31,27 \pm 0,66	31,42 \pm 0,40	32,03 \pm 0,15	32,10 \pm 0,82
	15	31,05 \pm 0,46	31,17 \pm 0,46	31,90 \pm 0,52	32,32 \pm 0,41

Não houve diferença entre tempos ou grupos.

* Valores de referência segundo Fisher e Graham (2018): 29-37 g/dL para CHGM.

6.1.2. Leucograma

Em relação ao número de leucócitos totais foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) no T3 de todos os grupos estudados (Tabela 4), independente do desafio ou tratamento. Infere-se que esse aumento seja decorrente de uma leucocitose de estresse que ocorreu no momento da coleta.

Apesar do GII, envenenado e tratado com solução salina, apresentar discreto aumento no número total de leucócitos, esse foi significativo ($p < 0,05$), mas proporcionalmente bem menor, quando comparado com os grupos que receberam secretoma. O aumento nos grupos tratados com secretoma chega perto de 100% e, nos grupos III e IV, houve uma leucocitose de acordo com Fisher e Graham (2018). É possível que o secretoma tenha substâncias pró-inflamatórias capazes de agir em sinergismo com o mecanismo inflamatório causado pelo veneno loxoscélico.

Tabela 5: Valores médios± desvio padrão do número de leucócitos / μ L, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa

	Tempo (Dias)	Grupos			
		GI	GII	GIII	GIV
Leucócitos	0	6.550±1.271 ^{Aa}	7.600±346 ^{Aa}	7.425±3.194 ^{Aa}	6.925±1.297 ^{Aa}
	3	11.125±3106 ^{Ab}	7.975±1.379 ^{Ab}	14.100±4.496 ^{Ab}	13.830±4.188 ^{Ab}
	9	8.375±1.556 ^{Aa}	7.150±1.307 ^{Aa}	7.800±655 ^{Aa}	8.350±3.332 ^{Aa}
	15	6.325±1567 ^{Aa}	5.800±1840 ^{Aa}	6.800±637 ^{Aa}	7.150±2515 ^{Aa}

Letras minúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas colunas. $p < 0,05$.

*Valores de referência segundo Fisher e Graham (2018): $5-12 \times 10^3 / \mu\text{L}$.

Alguns fatores podem interferir na avaliação dos leucócitos no loxoscelismo, como por exemplo, o tempo de coleta após o envenenamento, assim como a dose de veneno aplicada e a ativação de mecanismos endógenos, tais como a ativação do sistema complemento, migração de polimorfonucleares, liberação de enzimas proteolíticas e citocinas (Silva *et al.*, 2003; McGlasson *et al.*, 2007; Malaque *et al.*, 2011).

Silva *et al.* (2003) e Tavares *et al.* (2004) observaram a presença de leucopenia intensa 24 horas após a inoculação do veneno de *L. intermedia* e *L. gaucho*, respectivamente. Essa leucopenia está associada a neutropenia devido a intensa migração de neutrófilos para o tecido, horas após o acidente, o que acarreta um decréscimo transitório na circulação sanguínea. Em estudos realizados por Tavares *et al.* (2004), McGlasson *et al.* (2007) e Martins (2014) observa-se uma leucocitose significativa 72 horas após a inoculação do veneno de *L. gaucho*, *L. reclusa* e *L. laeta*, respectivamente que coincidem com o padrão observado nesses pacientes.

Em relação a contagem dos heterófilos, observou-se um aumento nos grupos I, III e IV no tempo 9 (Tabela 5), grupo esses tratados com secretoma, corroborando a hipótese da presença de substâncias pró-inflamatórias no secretoma. Já no grupo II houve uma discreta diminuição temporal no número de heterófilos. Essa diminuição pode ter relação com a migração dessas células para o local da lesão.

Tabela 6: Valores médios± desvio padrão da contagem de heterófilos / μ L, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa

	Tempo (dias)	Grupos			
		GI	GII	GIII	GIV
Heterófilos	0	2.945±693 ^a	2.952±1.07 ^a	3.435±1.046 ^a	2.645±182 ^a
	9	5.083±2.106 ^b	2.729±355 ^b	5.679±725 ^b	4.930±2.666 ^b
	15	2.454±1.532 ^a	1.981±68 ^a	3.914±509 ^a	4.141±1.720 ^a

Letras minúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas colunas. $P < 0,05$.

*Valores de referência segundo Campbell *et al.* (2012): $1,49 - 3,21 \times 10^3 / \mu\text{L}$.

Embora não tenha sido observadas alterações significativas ($p < 0,05$) na avaliação dos linfócitos (Tabela 7), houve uma linfopenia no tempo 9 nos mesmos grupos em que foi observado um aumento de heterófilos. Tavares *et al.* (2004) observaram a presença de linfopenia com 3 e 24 horas após a inoculação de veneno de *L. gaucho*.

Houve alteração significativa ($p < 0,05$) na avaliação de monócitos, porém os valores mantiveram dentro da normalidade para a espécie cunícula (Tabela 6). Já Tavares *et al.* (2004) observaram a presença de monocitose com 72 e 120 horas após a inoculação do veneno de *L. gaucho*. Novamente,

o que se destaca é o aumento do número de monócitos no grupo GIV, que recebeu secretoma via EV. Salienta-se que a monocitose com 120 horas é consistente com o estabelecimento de um processo inflamatório crônico.

A liberação de mediadores inflamatórios após a inoculação do veneno de *L. gaucho* em coxins de camundongos foi investigada e os resultados mostraram uma liberação acentuada de PGE₂ associada a um aumento de interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) e quimioatrativa de queratinócitos (Barbaro *et al.*, 2010).

Tabela 7: Valores médios± desvio padrão da contagem de linfócitos / μ L e monócitos / μ L, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa

	Tempo	Grupos			
	(dias)	GI	GII	GIII	GIV
Linfócitos	0	3.110±942 ^A	4.066±1.427 ^A	3.407±2.578 ^A	4.055±1.247 ^A
	9	2.862±1.212 ^A	4.357±777 ^A	1.649±200 ^A	2.942±734 ^A
	15	3.721±1.479 ^A	3.617±1.077 ^A	2.293±562 ^A	2.241±896 ^A
Monócitos	0	511±122 ^{Aa}	582±117 ^{Ab}	236±194 ^{Aa}	168±167 ^{Aa}
	9	409±302 ^{Aa}	201±111 ^{Aa}	394±110 ^{Aa}	321±169 ^{Aa}
	15	111±76 ^{Ab}	190±211 ^{Aa}	453±176 ^{Aa}	603±294 ^{Bb}

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas linhas e colunas, respectivamente. $P < 0,05$. *Valores de referência segundo Campbell *et al.* (2012): Linfócitos: $3,36 - 7,00 \times 10^3/\mu\text{L}$ e segundo Fisher e Graham (2018): Monócitos: $0,1 - 1,2 \times 10^3/\mu\text{L}$.

6.1.3. Plaquetas

A trombocitose ($p < 0,05$) observada no grupo III após três dias a inoculação do veneno associado ao tratamento com secretoma por via intradérmica (Tabela 8) provavelmente está relacionado a um processo inflamatório. A trombocitose reativa, ou secundária, ocorre devido a estimulação da trombopoiese por citocinas. Essa alteração está relacionada a diversos distúrbios, como processos inflamatórios, podendo ser transitória ou persistente (Stokol, 2010). No tempo 9, embora ainda haja trombocitose, é observado uma redução na contagem de plaquetas.

As plaquetas também demonstraram ter um papel na inflamação, além de também estarem envolvidas em distúrbios trombóticos locais induzida pelo veneno de *Loxosceles*. O veneno de *L. gaucho* induziu agregação plaquetária, adesão ao colágeno e aumentou a expressão de ligação induzida por ligante local 1 (LIBS1) e P-selectina, demonstrando o papel central das plaquetas no desenvolvimento da dermonecrose (Tavares *et al.*, 2011). Por outro lado, outro estudo mostrou que as plaquetas têm um papel na minimização da hemorragia, fenômenos inflamatórios e processos cicatrizantes, uma vez que coelhos com depleção de plaquetas mostraram mais reações graves após a aplicação do veneno de *Loxosceles* (Tavares *et al.*, 2016).

Tabela 8: Valores médios± desvio padrão da contagem de plaquetas / μ L, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa

Tempo (dias)	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
0	322.750±66.006 ^a	402.666±133.571 ^a	331.000±62.401 ^a	358.500±51.058 ^a
3	533.000±78.455 ^a	377.000±71.456 ^a	1.091.750±186.433 ^b	641.000±395.035 ^a
9	620.000±46.296 ^a	461.000±153.833 ^a	702.333±323.978 ^a	395.500±197.353 ^a
15	339.500±123.035 ^a	401.250±87.030 ^a	602.500±127.241 ^a	623.250±283.527 ^a

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas linhas e colunas, respectivamente. $P < 0,05$.

*Valores de referência segundo Campbell *et al.* (2012): $250 - 610 \times 10^3/\mu\text{L}$

Não foi observada a presença de trombocitopenia em nenhum dos tempos dos grupos experimentais estudados provavelmente devido ao tempo de coleta realizado após a inoculação do veneno loxoscélico. A trombocitopenia ocorre de forma precoce nos acidentes por *Loxosceles*, devido a formação de trombos que ocorre no local da picada (Silva *et al.*, 2003). Nas primeiras 12 horas após o envenenamento é observado um declínio abrupto na contagem de plaquetas com o reestabelecimento da normalidade após 72 horas (Pauli *et al.*, 2009).

O loxoscelismo cutâneo pode ser agravado em condições de trombocitopenia, visto que as plaquetas têm um papel importante redução de fenômenos hemorrágicos, além dos processos inflamatórios e cicatriciais (Tavares *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2016).

A interdependência entre a ocorrência de hemólise intravascular e a CID pode ser verificada em algumas patologias. A quebra da membrana eritrocitária resulta na liberação de ADP e exposição dos fosfolípidos na superfície celular, o que facilita a ativação da cascata de coagulação e induz a ativação plaquetária. Por outro lado, quando a hemólise é secundária a CID, a ativação sistêmica da coagulação acarreta a deposição de trombos na microcirculação, culminando em hemólise mecânica e anemia microangiopática. No loxoscelismo cutâneo visceral, sugere-se que a CID seja secundária à hemólise intravascular, mas o mecanismo responsável pelos sintomas sistêmicas ainda não está bem definido (Tavares *et al.*, 2004).

6.2. Mielograma

A medula óssea, principal órgão hematopoiético, é um dos maiores órgãos do corpo. É importante tanto como órgão linfóide primário quanto secundário. Como o sistema hematopoiético é um órgão-alvo potencial de exposição química, a avaliação do sangue e da medula óssea é fundamental nos estudos de avaliação de toxicidade ou segurança (Travlos, 2006).

A celularidade da medula óssea é estimada a partir da avaliação da proporção de células versus a quantidade de gordura presente nas partículas (Harvey, 2012). Observa-se aumento da celularidade quando há maior produção de linhas celulares mielóides ou eritróides em resposta à perda, à destruição ou ao consumo de células (Thrall e Weiser, 2012).

A maturação das células estava dentro do esperado, ou seja, cerca de 80 a 90% das células eram maduras. Entretanto, no presente estudo, pode-se ter superestimado a população celular, devido ao método de coleta, já que as amostras foram coletadas em uma única epífise femoral, podendo tender a uma região mais celular. Portanto, é importante que estes dados sejam comparados a de pacientes de mesma idade e com método de coleta semelhante.

Os animais do grupo I, que foram desafiados com NaCl 0,9% e tratados com secretoma por via intradérmica, não apresentaram nenhuma alteração significativa no mielograma. Já, os animais que foram desafiados com veneno de *L. intermedia*, grupo II e tratados com NaCl 0,9%, apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem de rubriblastos, mieloblastos, e aumento significativo na contagem de eosinófilos e megacariócitos (Tabela 9).

Tabela 9: Valores médios \pm desvio padrão da contagem do mielograma de coelhos com 15 dias após a inoculação do veneno de *Loxosceles intermedia*, tratados com NaCl 0,9%, secretoma via intradérmica e endovenosa

	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
RUBRIBLASTOS	2,28 \pm 0,73 ^A	0,78 \pm 0,29 ^B	1,85 \pm 0,50 ^A	2,43 \pm 0,71 ^A
PRÓ-RUBRICÍTOS	4,64 \pm 0,78 ^A	3,16 \pm 0,84 ^A	4,8 \pm 1,45 ^A	7,41 \pm 3,22 ^B
RUBRÍCITOS	26,37 \pm 5,38 ^A	22,64 \pm 3,84 ^A	32,65 \pm 4,84 ^A	31,18 \pm 5,92 ^A
METARRUBRÍCITOS	24,36 \pm 4,14 ^A	34,30 \pm 8,26 ^A	26,19 \pm 4,99 ^A	23,56 \pm 4,52 ^A
MIELOBASTOS	1,28 \pm 0,56 ^A	0,15 \pm 0,07 ^B	1,07 \pm 0,61 ^A	0,43 \pm 0,32 ^B
PROMIELÓCITOS	1,18 \pm 0,24 ^A	0,98 \pm 0,58 ^A	1,97 \pm 0,67 ^A	1,79 \pm 0,68 ^A
MIELÓCITOS	1,52 \pm 0,58 ^A	2,16 \pm 0,86 ^A	2,67 \pm 1,37 ^A	1,9 \pm 1,44 ^A
METAMIELÓCITOS	4,73 \pm 1,12 ^A	4,49 \pm 1,17 ^A	4,96 \pm 2,46 ^A	3,88 \pm 2,65 ^A
BASTONETES	10,54 \pm 2,08 ^A	13,160 \pm 3,64 ^A	13,76 \pm 4,95 ^A	18,02 \pm 9,19 ^A
HETERÓFILOS	20,27 \pm 4,01 ^A	15,34 \pm 2,20 ^A	23,27 \pm 11,87 ^A	15,64 \pm 3,58 ^A
EOSINÓFILOS	0,78 \pm 0,21 ^A	1,49 \pm 0,60 ^B	0,57 \pm 0,58 ^A	0,04 \pm 0,06 ^A
MACRÓFAGOS	0,03 \pm 0,03 ^A	0,03 \pm 0,06 ^A	0,12 \pm 0,04 ^A	0,05 \pm 0,70 ^A
LINFÓCITOS	1,69 \pm 0,69 ^A	1,03 \pm 0,29 ^A	1,03 \pm 0,63 ^A	0,55 \pm 0,31 ^A
PLASMÓCITOS	0,27 \pm 0,23 ^A	0,23 \pm 0,20 ^A	0,34 \pm 0,16 ^A	0,09 \pm 0,19 ^A
MEGACARIÓCITOS	9,42 \pm 1,78 ^A	14,72 \pm 1,76 ^B	11,15 \pm 2,5 ^A	14,20 \pm 3,34 ^A
RELAÇÃO M:E	0,69 \pm 0,07 ^A	0,70 \pm 0,17 ^A	0,75 \pm 0,38 ^A	0,67 \pm 0,32 ^A

Letras maiúsculas diferentes referem-se as médias distintas nas linhas ($p < 0,05$).

Apesar de a contagem de rubriblastos ter mostrado valores diminuídos no GII quando comparado com os demais grupos, não foi observada alteração na contagem de hemácias no sangue periférico. Teria o veneno uma ação nos precursores de eritrócitos? Silva *et al.* (2003) observaram uma diminuição significativa das células vermelhas nucleadas com 12h, 24h e 5 dias após a inoculação do veneno da *L. intermedia*. Também não foi vista alteração alguma na morfologia dessas células.

O aumento de eosinófilos nos animais do grupo II pode estar relacionado a uma reação de hipersensibilidade cutânea que ocasionou um aumento na produção devido a uma maior demanda tecidual ou em associação com condições inflamatórias. Já o aumento de megacariócitos pode ser devido a uma inflamação tecidual causada pelo veneno loxoscélico. Apesar de ter sido observado esse aumento na contagem de megacariócitos, a contagem de plaquetas no sangue periféricos manteve-se dentro dos valores de normalidade e não foi observado a presença de alteração significativa no tempo 15.

Silva *et al.* (2003) observaram uma diminuição na celularidade medular em todos os animais que foram expostos a ação do veneno após 12 e 24 horas. A recuperação da celularidade iniciou-se com 48 horas e com retorno aos valores basais em cinco dias. A célula que determina a queda da celularidade é o neutrófilo. A queda da celularidade, neutrófilos medulares e periféricos, observada por esses pesquisadores, confirma a presença de neutrófilos nos achados teciduais relatados por Elston *et al.* (2000). Embora não tenha sido observado diferença estatística na celularidade no presente estudo, observar-se que houve uma diminuição na quantidade de heterófilos em comparação com os valores de referência relatados para a espécie canícula, Bollinger *et al.* (2010) e Riedel (2017).

Elston *et al.* (2000) observaram a presença de uma grande quantidade de eosinófilos e neutrófilos nos infiltrados dérmicos e que a degranulação de eosinófilos adjacentes ao local da necrose sugerem que eles desempenham um papel na lesão tecidual após o envenenamento experimental pela aranha marrom. Silva *et al.* (2003) não observaram alterações nas concentrações de eosinófilos na medula óssea ou no sangue periférico, não sendo observado diferença significativa entre os grupos teste e controle. Esses pesquisadores observaram a depressão de megacariócitos em associação a trombocitopenia periférica após quatro e 12 horas da inoculação do veneno da *L. intermedia*, seguida de recuperação dentro de cinco dias.

Os mieloblastos também se mostraram diminuídos ($p < 0,05$) no grupo IV (desafio com veneno de *L. intermedia* e tratamento com secretoma EV) em comparação com os grupos I e III. Porém a diminuição observada não ocasionou alteração na série leucocitária da circulação sanguínea. Provavelmente essa diferença significativa seja devido ao valor do desvio padrão (Tabela 8). A neutropenia periférica e medular relatada por Silva *et al.* (2003) estão correlacionadas com as alterações teciduais observadas.

Existe a possibilidade de o veneno ter uma ação transitória na medula, mas de forma indireta, devido aos processos hemolíticos e alteração no *pool* circulante de neutrófilos provocado pelo consumo dessas células no local da dermonecrose.

O grupo IV mostrou aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem de pró-rubricitos (Tabela 8) quando comparado com os demais grupos. É importante salientar que esse grupo apresentou uma diminuição do número de hemácias, especialmente nos tempos 3 e 9 dias, com tendência de normalização aos 15 dias.

A maior ou menor produção de linhagens celulares altera a razão M:E e tais alterações devem ser interpretadas em associação com o hemograma do paciente (Thrall e Weiser, 2012). No presente estudo não foi observado alteração na razão M:E no tempo avaliado (Figura 6), o que não foi relatado no trabalho de Silva *et al.* (2003). Já era esperado que não ocorresse alteração nessa razão, uma vez que no tempo em que se realizou o mielograma (15º dia), não houve alteração no hematócrito e na contagem de leucócitos no sangue periférico, assim como alteração na série eritrocítica e mieloide.

O veneno da aranha marrom dissemina na corrente circulatória, chegando a vários órgãos e provavelmente na medula óssea (Silva *et al.*, 2004; Silva, 2005). Estes pesquisadores avaliaram a celularidade da medula óssea e do sangue periférico de coelhos após a inoculação experimental do veneno da *L. intermedia*. Como esperado não foi observado alteração na série vermelha em sangue periférico, uma vez que os eritrócitos da espécie cunícula são resistentes a ação do veneno devido à ausência de glicoforinas. Entretanto, foi observado uma depleção da celularidade medular após 12 e 24 horas após a exposição ao veneno com recuperação da celularidade após 48 horas e retorno aos valores basais em cinco dias.

No presente experimento, o veneno da *L. intermedia* na dose utilizada (10µg) causou alterações na medula óssea, no 15º dia, especialmente no GII. O grupo GIII (desafio com *L. intermedia* e tratamento com secretoma ID), apresentou comportamento bem semelhante ao grupo I (desafio com NaCl 0,9% e tratamento com secretoma).

A ação do veneno loxoscélico na medula óssea pode ser uma toxicidade primária e secundária, sendo esses efeitos tóxicos e compensatórios (Bloom *et al.*, 2013).

7. Conclusões

Nas condições em que esse experimento foi realizado, pode-se concluir que:

O veneno da *L. intermedia* causou alterações medulares tais como, diminuição significativa na contagem de rubriblastos, mieloblastos, e aumento significativo na contagem de eosinófilos e megacariócitos.

O tratamento com secretoma, tanto por via ID como EV, foi capaz de reverter as alterações medulares causadas pelo veneno de *L. intermedia*, normalizando os valores de rubriblastos, mieloblastos e eosinófilos.

Diante das alterações observadas no mielograma, há a possibilidade do secretoma ter algum efeito na medula óssea sendo necessário a realização de novos estudos.

8. Referências Bibliográficas

ABDULKADER, R.C.M.; BARBARO, K.C.; BARROS, E.J.G.; BURDMANN, E.A. Nephrotoxicity of insect and spider venoms in Latin America. *Semin. Nephrol.*, v. 28, n. 4, p. 373-382, 2008.

ACOSTA L.; HMADCHA, A.; ESCACENA, N. *et al.* Adipose mesenchymal stromal cells isolated from type 2 diabetic patients display reduced fibrinolytic activity. *Diabetes*, v. 62, n.12, p. 4266-269, 2013.

ALBUQUERQUE, P.L.M.M.; TESSAROLO, L.D.; MENEZES, F.H. *et al.* Acute kidney injury due to systemic Loxoscelism: a cross-sectional study in Northeast Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 51, p. 695-699, 2018.

ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A. L. *et al.* Ontogenic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, v. 37, p. 627-632, 1999.

ANDRADE, R.M.G.; TAMBOURGI, D.V. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the West Zone of São Paulo City, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, p. 425-426, 2003.

AZEVEDO, R.; TEIXEIRA, P.M.S.; SIQUEIRA, R.C.L.; BRECOVIT, A.D. New record and distribution of *Loxosceles amazoniza* Gertsch, 1967 (Araneae: Sicariidae) in the state of Ceará, Brazil. *Check List*, v.10, n.1, p.207-208, 2014.

BABCOCK, J.L.; CIVELLO, D.J.; GEREN, C.R. Purification and characterization of a toxin from brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom gland extracts. *Toxicon*, v.9, p.677-689, 1981.

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.

BAGLIO, S.R.; PEGTEL, D.M.; BALDINI, N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front. Physiol.*, v. 3, p. 1-11, 2012.

BAILO, M.; SONCINI, M.; VERTUA, E. *et al.* Engraftment Potential of Human Amnion and Chorion Cells Derived from Term Placenta. *Transplantation*, v. 78, n. 10, p. 1439-1448, 2004.

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

BARBARO, K.C.; KNYSAK, 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.

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.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F. *et al.* Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med. Bio. Res.*, v. 29, p. 1491-1497, 1996.

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

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C. Mecanismo de ação do veneno de *Loxosceles* e aspectos clínicos do loxoscelismo. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADAD JR. V. (Ed). *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*: Savier, São Paulo, 2003. p. 160-174.

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.

BARI, E; PERTEGHELLA, S.; DI SILVESTRE, D. *et al.* Pilot production of mesenchymal stem/stromal freeze-dried secretome for cell-free regenerative nanomedicine: a validated GMP-compliant process. *Cells*, v. 7, n. 11, p. 190, 2018.

BARRET, S.M; JENKINGS, M.R; FISHER, D.E. Dapsone or electric Shock therapy of brown recluse spider envenomation? *Ann. Emerg. Med.*, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1994.

BARRETO FILHO, J. B.; OLIVEIRA, M. S. Placental Structure and Biological Aspects of Fetal Membranes Cultured *in vitro*. In: CECCHERINI-NELLI, L.; MATTEOLI, B. (Eds.). *Biomedical Tissue Culture*. In Tech, 2012. p. 115-132.

BARRETO, O.C.O; PRESTES, K.S; FONSECA, L.K.F *et al.* Functional alterations of rabbit erythrocytes induced by *Loxosceles gaucho* venom. *Hum. Exp. Toxicol*, v. 26, p. 817-821, 2007.

BASCUR, L.; YEVENES, I.; BARJA, P. Effects of *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. *Toxicon*, v. 20, p.795-796, 1982.

BINER, O.; TRACHSEL, C.; MOSER, A. *et al.* Isolation, N-glycosylations and function of a hyaluronidase-like enzyme from the venom of the spider *Cupiennius salei*. *PLoS One*, v. 10, p. 1-32, 2015.

BLOOM, J.C.; SCHADE, A.E.; BRANDT, J.T. Toxic responses of the blood. In: KLAASSEN, C.D (ED). *Casaret and Doull's Toxicology – The basic Science of poisons*. McGraw-Hill Education, 2013, p. 527-558.

BOLLINGER, A, P.; EVERDS, N.E.; ZIMMERMAN, D.M. *et al.* Hematology of laboratory animals. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (Ed). *Schalm's Veterinary Hematology*: Wiley-Blackwell, 2010 p. 852 -887.

BORDON, K.C.; WIEZEL, G.A.; AMORIM, F.G.; ARANTES, E.C. Arthropod venom hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, v. 21, p. 43, 2015.

BORKAB, J.; GROSS, E.; LUBIN, Y.; ORYAN, I. An outbreak of venomous spider bites in a citrus grove. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 52, n. 3, p. 228-230, 1995.

BRANCO, S.E.M.T.; MARTINS, G.C.; FRANÇA, S.A. *et al.* Loxoscelismo cutâneo-visceral em cão na cidade de Belo Horizonte – MG: Relato de caso. *Clínica Veterinária* (São Paulo), v. 111, p. 84-90, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, 2ª ed. Fundação Nacional de Saúde, Brasília.

BURDMANN, E.A.; JHA, V. Acute kidney injury due to tropical infectious diseases and animal venoms: a tale of 2 continents. *Kidney Int.*, v. 91, p. 1033-1046, 2017.

CAMPBELL, T.W. Chemical Chemistry of Mammals: Laboratory Animals and Miscellaneous Species. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. (Ed). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Willey-Blackwell, 2012. p. 225-237.

CASTRO, C.S.; SILVESTRE, F.G.; ARAUJO, S.C. *et al.* Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon*, v. 44, p. 273-280, 2004.

CHAIM, O.M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D. *et al.* Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins*, v. 3, p. 309-344, 2011.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; SILVERIA, R.B. *et al.* Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v. 25, p. 2739-2749, 2007.

CHAVES-MOREIRA, D.; SENFF-RIBEIRO, A.; WILLE, A.C.M. *et al.* Highlights in the knowledge of brown spider toxins. *J. Venom. Anim. Toxins. incl. Trop. Dis*, v. 23, n. 6, 2017.

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, p. 695-704, 2008.

CHU, J.Y.; RUSH, C.T.; O'CONNOR, D.M. Hemolytic anemia following brown spider (*Loxosceles reclusa*) bite. *Clin. Toxicol.*, v. 12, p. 531-534, 1978.

CLEMENT, H.; OLVERA, A.; RODRÍGUEZ, M. *et al.* Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon*, v. 60, n. 7, p.1223-1227, 2012.

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, n. 2, p.179-195, 2008.

CORDEIRO, F.A; AMORIM, F.G.; ANJOLETTE, F.A.P.; ARANTES, E.C. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, v. 21, 2015.

CRISTIANO, M.P.; CARDOSO, D.C.; RAYMUNDO, M.S. Contextual analysis and epidemiology of spider bite in Southern Santa Catarina State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 103, p. 943-948, 2009.

CRIVELLI, B.; CHLAPANIDAS, T.; PERTEGHELLA, S. *et al.* Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. *J. Control. Release*, v. 262, p. 104–117, 2017.

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.

DAHLGREN, L. A. Stem Cell Therapy. *In: ROBINSON, N.E; SPRAYBERRY, K. (Org.). Current therapy in equine medicine*, chap. 199, p. 908-911, 2009.

DANTAS, A.E.; CARMO, A.O.; HORTA, C.C. *et al.* Description of Loxtox protein family and identification of a new group of phospholipases D from *Loxosceles similis* venom gland. *Toxicon*, v. 120, p. 97-106, 2016.

DAVANZO, F.; REBUTTI, I.; PANZAVOLTA, F.G. *et al.* Loxoscelism: Proposal of a new protocol for treatment. *J. Clin. Case Rep.*, v. 6, n. 3, 2016.

DE COPPI, P.; BARTSCH, G.; SIDDIQUI, M. M. *et al.* Isolation of Amniotic Stem Cell Lines with Potential for Therapy. *Nat. Biotechnol.*, v. 25, p. 100-106, 2007.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.*, v. 28, p. 875-884, 2000.

DENNY, W.F.; DILLAHA, C.J.; MORGAN, P.N. Hemotoxic effect of *Loxosceles reclusus* venom: in vivo and in vitro studies. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 64, p. 291-298, 1964.

DIKOVINOVA, N.V. The absolute number of cells in bone marrow and myelograms of normal rabbits. *Byull Eksp. Biol. Med.*, v. 44, p. 1129-1132, 1957.

DOMINICI, M.L.; LE BLANC, I.; MUELLER, I. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

ELISSEEFF, J. *et al.* Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod. Craniofac. Res.*, v. 8, n. 3, p. 150-161, 2005.

ELSTON, D.M.; EGGERS, J.S.; SCHIMIDT, W.E. *et al.* Histological findings after brown recluse spider envenomation. *Am. J. Dermatopathol.*, v. 22, p. 242-246, 2000.

ELSTON, D.M.; MILLER, S.D.; YOUNG, R.J. *et al.* Comparison of colchicine, dapsone, triamcinolone, and diphenhydramine therapy for the treatment of brown recluse spider envenomation. *Arch. Dermatol.*, v. 141, p. 595-597, 2005.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. *et al.* Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*, v. 36, 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 Negl Trop Dis*, v.7, n.5, p.1-12, 2013.

FIERABRACCI, A.; DEL FATTORE, A.; MURACA, M. The immunoregulatory activity of mesenchymal stem cells: State of art and future avenues. *Curr. Med. Chem.*, n. 23, p. 3014-3024, 2016.

FINGERMANN M.; DE ROODT A.R.; CASCONI, O. *et al.* Biotechnological potential of phospholipase D for *Loxosceles* antivenom development. *Toxicon: X*, v. 6, 100036, 2020.

FISHER, P.; GRAHAM, J. Rabbits. In: CARPENTER, J.W. (Ed) *Exotic Animal Formulary*. Elsevier, 2018. p.494-531.

FOIL, L.D.; FRAZIER, J.L.; NORMENT, B.R. Partial characterization of lethal and neuroactive components of the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom. *Toxicon*, v. 17, p. 347–54, 1979.

FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet. Surg.*, v. 34, p. 415-423, 2005.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.*, v. 304, p. 261-267, 1992.

FUTRELL, J.M.; MORGAN, B.B.; MORGAN, P.N. An *in vitro* model for studying hemolysis associated with the venom from brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). *Toxicon*, v. 17, p. 355-362, 1979.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 174, p. 90-99, 1976.

GNECCHI, M.; HUAMEI, H.; LIANG, O. *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.*, v. 11, n. 4, p. 367-368, 2005.

GREMSKI, L.H.; SILVA, T.D.; FERRER, V.P. *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.

HARVEY, J.W. *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas*: Elsevier, 2012, 360 p.

HOGAN, C.J; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.*, v. 44, p. 608-624, 2004.

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

ISBISTER, G.K; WHYTE, I.M. Suspected white-tail spider bite and necrotic ulcers. *Int. Med. J.*, v. 34, n. 1, p. 38-44, 2004.

JIANG, W.; MA, A.; WANG, T. *et al.* Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. *Transplant Int.*, v. 19, p. 570-580, 2006.

JONG, Y.S.; NORMENT, B.R.; HEITZ, J.R. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa* – II. Protease enzyme activity. *Toxicon*, v. 17, p. 529-537, 1979.

KIM, K.H.; BLASCO-MORENTE, G.; CUENDE N., ARIAS-SANTIAGO, S. Mesenchymal stromal cells: properties and role in management of cutaneous diseases. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, v. 31, n. 3, p. 414-423, 2017.

KING, J.D. Toxicant-induced renal injury. In: BRENT, J.; BURKHART, K.; DARGAN, P. *et al.* (Ed). *Critical Care Toxicology*: Springer, Cham, 2017. p. 409-423.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity for a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 678, n. 3, p. 467-476, 1981.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.M. *et al.* Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie*, v. 90, p. 1722-1736, 2008.

LI, Y.; YANG, W.; ZHANG, Q. *et al.* An Update on the Potential of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Diseases. *Stem Cells Int.*, v. 2021, 2021.

LIMA, A.S. Produção e caracterização funcional de proteína quimérica multiepitópica contendo peptídeos das principais toxinas de aranhas do gênero *Loxosceles*. 2016. 87f. Dissertação (Mestrado Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LODEN, J.K.; SEGER, D.L.; SPILLER, H.A. *et al.* Cutaneous-hemolytic loxoscelism following brown recluse spider envenomation: new understandings. *Clin. Toxicol.*, v. 58, n. 12, p. 1297-1305, 2020.

LOPES, P.H.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C.C.; MARQUES, M.O.T.; TAMBOURGI, D.V. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. *Arch. Toxicol.*, v. 94, p. 1461-1477, 2020.

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. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 52, n. 4, p. 455-467, 2004.

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

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. *J. Venom. Anim. Toxins. incl. Trop. Dis.*, v.15, n.3, p.572-581, 2009.

MALAQUE, 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. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.44, n.3, p.139-143, 2002.

MALAQUE, C.M.S.; CHAIM, O.M.; ENTRES, M.; BARBARO, K.C. *Loxosceles* and loxoscelism: biology, venom, envenomation, and treatment. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; CORZO, G.; DE LIMA, M.; DIEGO-GARCÍA, E. (Eds). *Spider Venoms. Toxinology*. Springer, Dordrecht, 2016, p. 419-444.

MALAQUE, C.M.S.; SANTORO, M.L.; CARDOSO, J.L.C. *et al.* Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon*, v. 58, p. 664–671, 2011.

MALAQUE, C.M.S.; VETTER, R.S.; ENTRES, M. *Loxosceles* spiders. In: BRENT, J.; BURKHART, K.; DARGAN, P. *et al.* (Eds). *Critical Care Toxicology. Diagnosis and management of the critically poisoned patient*. Springer, Dordrecht, 2017, p. 2577-2594.

MARCELINO, S.A.C.; SERAKIDES, R.; CASTRO-SILVA, V.N. *et al.* Use of bone marrow for detection of toxic chemicals for the elucidation of poisoning in forensic veterinary medicine. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 40, n. 10, p. 798 – 803, 2020.

MARTINS, D.C.G. *Tratamento da lesão dermonecrótica 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.

MARTINS, G.C.; BARRETO, M.S.O.; BOTELHO, A.F. *et al.* Evaluation of mesenchymal cells and dapsona for the treatment of dermonecrotic wounds caused by *Loxosceles laeta* venom in rabbits. *Cienc. Anim. Bras.* v.22, 2022.

MAYNOR, M.L; MOON, R.E; KLITZMAN, B. *et al.* brown recluse spider envenomation: a prospective trial of hyperbaric oxygen therapy. *Acad. Emerg. Med.*, v.4, n.3, p.184-192, 1997.

MCGLASSON, D.L; HARROFF, H.H; SUTTON, J. *et al.* Cutaneous and systemic effects of varying doses of brown recluse spider venom in a rabbit model. *Clin. Lab. Sci.*, v.20, n.2, p.99-105, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: SVS - SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2021. <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>

MORAN, O.; ZA VALETA, A.; CASTRO, D.M.R. Hematological effects of *Loxosceles laeta* venom in albino mice. *Bol. Chil. Parasitol.*, v. 36, p. 20–23, 1981.

MORGAN P.N. Preliminary studies on venom from the brown recluse spider *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*, v. 6, p. 161-165, 1969.

MOURA, J.F. *Caracterização imunológica e molecular da fração dermonecrótica do veneno da aranha marrom *Loxosceles intermedia**. Belo Horizonte, 2005. 146f. 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.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.*, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

NOGUEIRA, R.M.B.; SAKATE, M.; SANGIORGIO, F. *et al.* Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic sérum – part I: clinical evaluation, hematology and myelogram. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 13, n. 4, 2007.

NORMENT, B.R.; JARRATT, J.H. Electrophoresis and electrofocusing of venom of *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik (Araneida: Scytodidae). *J Med Entomol.*, v. 13, p. 143–7, 1976.

NOWATZKI, J.; SENE, R.V.; PALUDO, K.S. *et al.* Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. *Toxicon*, v. 56, p. 535-543, 2010.

NOWATZKI, J.; SENE, R.V.; PALUDO, K.S. *et al.* Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom triggers endothelial cells death by anoikis. *Toxicon*, v.60. p.396-405, 2012.

OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; PIAZZA, R.M.F. *et al.* Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*, v. 45, p. 421-429, 2005.

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. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 83, p. 287–294, 2002.

ÖZAKAN, C.; KAYA, A.; AKGÜL, Y. Normal values of haematological and some biochemical parameters in serum and urine on New Zealand White rabbits. *World Rabbit Sci.*, v. 20, p. 253-259, 2012.

PATEL, K.D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G.A. *et al.* The necrotic venom of brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. *J. Clin. Invest.*, v. 94, p. 631–642, 1994.

PAULI, I; MINOZZO, J.C; SILVA, P.H *et al.* 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.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon*, v. 48, p. 123-137, 2006.

PETERSON, M.E. Brown Spider Envenomation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, v. 21, p. 191-193, 2006.

PHILLIPS, S; KOHN, M; BAKER, D. *et al.* Therapy of brown spider envenomation: a controlled trial of hyperbaric oxygen, dapsone and cyproheptadine. *Lab. Invest*, v.25, n.3, p.363-368, 1995.

R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REAGEN, W.J.; IRIZARRY-ROVIRA, A.; POITOUT-BELISSENT, F. *et al.* Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Toxicol Pathol.*, v. 39, p. 435 – 448, 2011.

REES, R.S; ALTENBERN, D.P; LYNCH, J.B. *et al.* Brown recluse spider bites. A comparison of early surgical excision versus dapsone and delayed surgical excision. *Ann. Surg.*, v. 202, n. 5, p. 659-663, 1985.

RIBEIRO, O.M.B.B.; CHATZAKI, M.; SALES, M.D.F. *et al.* From taxonomy to molecular characterization of brown spider venom: An overview focused on *Loxosceles similis*. *Toxicon*, v. 173, p. 5-19, 2020.

RIEDEL, R.M.; MATOS, R.; SCHAEFER, D.A. Bone marrow cell composition and morphology in healthy juvenile female New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Am. J. Vet. Res.*, v. 78, n. 8, p. 910-918, 2017.

RODRIGUES, M.G. *Secretoma no tratamento de lesão dermonecrótica induzida pelo veneno de Loxosceles intermedia*. 2021. 95f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING, L.E. Necrotic arachnidism. *J Am Acad Dermatol.*, v. 44, p. 561-576, 2001.

SANCHEZ-CASTRO, E.E.; PAJUELO-REYES, C.; TEJEDO, R. *et al.* Mesenchymal Stromal Cell-based therapies as promising treatments for muscle regeneration after snakebite envenoming. *Front. Immunol.*, v. 11, p. 609961, 2020.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelismo em Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 31, n. 6, p. 403-415, 1989.

SEZERINO, U.M; ZANNIN, M; KOWLASKI, L. *et al.* A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.92, p.546-548, 1998.

SILVA, D.T.; GREMSKIM L.H.; CHAIM, O.M. *et al.* Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie*, v. 92, n. 1, p. 21-32, 2010

SILVA, P.H. *Aranha marrom e Loxoscelismo: revisão bibliográfica e ação sobre os tecidos hematopoiético e renal.* 2005. 87f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; 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.

SILVA, P.H.; SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H. *et al.* Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, v. 44, p. 693-709, 2004.

SILVEIRA, A.L. New geographic records of the brown spider *Loxosceles amazonica* Gertsch, 1967 (Araneae, Sicariidae) in the Northeastern Brazil and its medical importance. *Rev Med Minas Gerais*, v.25, n.1, p.37-45, 2015.

SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C. *et al.* Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -Nacetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, v. 49, p. 758-768, 2007.

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, n.6, p. 815-822, 2002.

SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, v.4, n.11, p.616-627, 2008.

SITPRIJA, V.; BOONPUCKNAVIG. V. Kidney injury and animal toxins. *Toxinology*, p. 1-22, 2014.

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

SMITH, C.W.; MICKS, D.W. A comparative study of the venom and other components of three species of *Loxosceles*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 17, p. 651-656, 1968.

SMITH, W.C.; MICKS, W.D. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider *Loxosceles reclusa*. *Lab. Invest.*, v. 22, p. 90–93, 1970.

SOUZA, A.L.; MALAQUE, C.M.; SZTAJNBOK, J. *et al.* *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon*, v. 51, n. 1, p. 151-156, 2008.

STACY, N.I.; HARVEY, J.W. Bone marrow aspirate evaluation. *Vet. Clin Small Anim.*, v. 47, p. 31 – 52, 2017.

STOKOL, T. Essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (Ed). *Schalm's Veterinary Hematology*: Wiley-Blackwell, 2010, p.605-611.

SUAREZ, G.; BIGGEMANN, U.; SCHENONE, H. Biochemical study of the venom of *Loxosceles laeta* and of its mechanism of action. *Bol. Chil. Parasitol.*, v.26, p. 60–62, 1971a.

SUAREZ, G., SCHENONE, H., SOCIAS, T. *Loxosceles laeta* venom – partial purification. *Toxicon*, v. 9:291, 1971b.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. *Clin. Dermatol.*, v. 24, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *et al.* Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 251, p. 366–73, 1998.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; ANDRADE, R.M. *et al.* *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood*, v. 95, n. 2, p. 683–691, 2000.

TAMBOURGI, D.V.; PEDROSA, M.F.; ANDRADE R.M. *et al.* Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. *Mol. Immunol.*, v. 44, n. 4, p. 576–582, 2007.

TAMBOURGI, D.V.; PETRICEVICH, V.L.; MAGNOLI, F.C. *et al.* Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon*, v.36, p.391-403, 1998.

TAVARES, F.L.; PEICHOTO, M.E.; MARCELINO, J.R. *et al.* Platelet participation in the pathogenesis of dermonecrosis induced by *Loxosceles gaucho* venom. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 35, n. 6., p. 666 – 676, 2016.

TAVARES, F.L.; SILVA, M.C.C.S.; SANTORO, M.L. *et al.* Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 23, p. 477-486, 2004.

TEIXEIRA, F.G.; CARVALHO, M.M.; SOUZA, N. *et al.* Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 70, n. 20, p. 3871-3882, 2013.

TEIXEIRA, F.G.; SALGADO, A.J. Mesenchymal stem cells secretome: Current trends and future challenges. *Neural Regen. Res.*, v. 15, n. 1, p. 75, 2020.

THRALL, M.A.; WEISER, G. Laboratory evaluation of bone marrow. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. (Ed). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Willey-Blackwell, 2012. p. 150-165.

TOMA, J. G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K. J. L. *et al.* Isolation of Multipotent Adult Stem Cells from the Dermis of Mammalian Skin. *Nat. Cell Biol.*, v. 3, p. 778-784, 2001.

TRAVLOS, G.S. Histopathology of bone marrow. *Toxicol Pathol.*, v. 34, p. 566 – 598, 2006.

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V.L.P. *et al.* Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.*, v. 32, n. 7, p. 397-408, 2000a.

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

VETTER, R.S. Identifying and misidentifying the brown recluse spider. *Dermatol. Online J.* v. 5, n.7, 1999.

VETTER, R.S. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): A review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. *J. Arachnol.*, v. 36, p. 150–163, 2008.

VETTER, R.S. Scavenging by spiders (Araneae) and its relationship to pest management of the brown recluse spider. *J. Econ. Entomol.*, v. 103, n. 3, p. 986-989, 2011.

VIZOSO, F.J.; EIRO, N.; CID, S. *et al.* Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 18, 2017.

WHITE, J.; CARDOSO, J.L.; FAN, H.W. Clinical toxicology of spider bites. In: Handbook of: Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 259 – 330.

WORLD SPIDER CATALOG (2021) Word spider catalog version 22.5. In: <https://wsc.nmbe.ch/genus/3087/Loxosceles>

WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.D.; CAMPBELL, B.J.; BARRETT, J.T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 159, p. 415–26.

WRIGHT, S.W.; WREN, K.D.; MURRAY, L.; SEGER, D. Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. *Ann. Emerg. Med.*, v. 30, n.1, p. 28-32, 1997.

YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*, v.39, p.391-400, 2001.

ZAKRZEWSKI, W.; DPBRZYNSKI, M.; SZYMONOWICZ; RYBAK, Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 10, n. 68, 2019.

ZANETTI, V.C.; SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L. *et al.* Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, v.13, p.135-148, 2002.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. *et al.* Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.*, v. 7, p. 211-228, 2001.

9. Anexos

9.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

COMPROVANTE

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

Belo Horizonte, 21/06/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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