

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de veterinária
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

Gabriela Marques Rodrigues

**SECRETOMA NO TRATAMENTO DE LESÃO DERMONECRÓTICA
INDUZIDA PELO VENENO DE *LOXOSCELES INTERMEDIA***

BELO HORIZONTE
2021

GABRIELA MARQUES RODRIGUES

**Secretoma no tratamento de lesão dermonecrótica induzida pelo veneno de
*Loxosceles intermedia***

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.
Área: Medicina e Cirurgia Veterinária
Orientadora: Profa. Dra. Marília Martins Melo

BELO HORIZONTE – MG
Escola de Veterinária - UFMG

2021

R696s Rodrigues, Gabriela Marques, 1993 -
Secretoma no tratamento de lesão dermonecrótica induzida pelo veneno de *Loxosceles intermedia*/ Gabriela Marques Rodrigues. – 2021.

96 f.:il.

Orientadora: Marília Martins Melo
Dissertação (Mestrado) apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinária.
Bibliografias: f. 77 a 95.

1. Aranha - Veneno – Teses - 2. *Loxosceles* - Teses - 3. Loxoscelismo - Teses - 4. Ciência Animal - Teses - I. Melo, Marília Martins - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

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

GABRIELA MARQUES RODRIGUES

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

Aprovado(a) em 31 de maio de 2021, pela banca constituída pelos membros:

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

Dr.(a). Felipe Pierezan

Dr.(a). Ana Flávia Machado Botelho



Documento assinado eletronicamente por **Marília Martins Melo**, Professora do Magistério Superior, em 31/05/2021, às 17:07, 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 01/06/2021, às 13:20, 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 **Felipe Pierezan**, Professor do Magistério Superior, em 08/06/2021, às 09:17, 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 **0735700** e o código CRC **A6F7037B**.

Dedico esse trabalho a minha amada
família e a todos os animais que passaram pela minha vida...

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pela vida e por todas as oportunidades que Ele proporcionou até hoje. Nesta longa jornada até aqui, Deus sempre esteve comigo e me forneceu tudo que eu precisava. Só Ele sabe tudo o que eu vivi ao longo desses anos e quão difícil é abrir mão de estar perto da família para buscar os nossos sonhos.

Agradeço pela minha família maravilhosa a qual eu tenho muito orgulho. Ao meu pai Itamar Rodrigues de Sousa, por sempre acreditar em mim e lutar junto comigo pelos meus sonhos, desde Viçosa até aqui. Por me ensinar meus valores e principalmente a lutar pelos meus objetivos. À minha mãe Celina Rodrigues da Silva, que esteve comigo em todos os momentos, me apoiando incondicionalmente ao longo da minha trajetória e por ser a minha fonte de forças e de amor. Obrigada meus pais, por tudo que abriram mão e batalhavam para eu chegar até aqui. Minha irmã Marina Marques Rodrigues, que me acompanhou em cada choro e cada alegria ao longo desses dez anos longe de casa, obrigada por sempre ser minha melhor amiga, meu refúgio, e por nos dar o maior presente de nossas vidas, nosso príncipe João Gabriel Marques dos Reis.

Agradeço a minha orientadora Marília Martins Melo e meu coorientador Carlos Delfin Chavez Olortegui, por todos os ensinamentos, orientação, paciência e confiança. Tenho imenso orgulho de ser orientada por vocês e por agora fazer parte desta instituição que eu tanto admiro. Gratidão ao professor Raphael Wenceslau por toda ajuda, dedicação e paciência com a elaboração dessa dissertação.

Quero agradecer imensamente as alunas de iniciação científica, Jessica Cruz, Paula Bretas, Kai Abreu e Fran Araújo e, também a doutoranda Maria Elvira, por toda ajuda durante o experimento e elaboração dessa dissertação.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras, onde realizei a minha graduação e que iniciei minha trajetória na clínica de pequenos animais e na dermatologia veterinária, minha profunda gratidão ao professor Carlos Artur Lopes Leite. Minha eterna gratidão a Universidade Federal de Minas Gerais, por ter me proporcionado a realização do mestrado, no qual pude aprimorar meus conhecimentos e tive grande aprendizado.

Minha gratidão ao Santo Agostinho Hospital Veterinário, em especial ao Dr. Vitor Ribeiro, Dr. Benjamim Maciel, Dr. Marthin Raboch Lempek, Dra. Nicole Machado e Dra. Luciene Both, pela amizade, acolhimento e todos os ensinamentos. Agradeço a clínica veterinária Quatro Patas, em especial ao Natalino Oliveira e Ewerton Nunes pelo apoio incondicional e amizade.

Gratidão a todos os meus amigos de Arcos e Belo Horizonte, pelo apoio, incentivo e compreensão durante a minha trajetória.

Agradeço em especial a todos os animais que passaram pela minha vida, desde os pacientes, os “filhos” e os que participaram desse experimento. Minha gratidão e respeito pelas suas vidas.

*“Aonde quer que seja, ainda que a distância seja imensa, se for para alcançar o que é seu,
nunca deixe de buscar”.*

Padre Fábio de Melo

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos do secretoma, em feridas dermonecróticas em coelhos submetidos à injeção de veneno de *Loxosceles intermedia*. Foram utilizados 16 coelhos machos, adultos, Nova Zelândia, com peso médio de 2,0 kg, distribuídos em quatro grupos (n=4). À exceção do grupo controle (grupo I), que foi submetido apenas à aplicação de secretoma (60µg de secretoma diluído em tampão fosfato-salina a 0,5%), todos os outros grupos foram submetidos à administração de 10µg de veneno de *Loxosceles intermedia*, diluído em NaCl 0,9%, via intradérmica (ID) na região interescapular e, tratados 30 minutos após a injeção do veneno, da seguinte forma: grupo II (NaCl 0,9%, via ID); grupo III (60µg de secretoma diluído em tampão fosfato-salina 0,5%, via ID) e, grupo IV (60µg de secretoma diluído em tampão fosfato-salina 0,5% via endovenosa - EV). Os animais foram avaliados diariamente e realizados registros fotográficos em altura pré-definida de 30 cm para posterior análise da evolução da área da ferida por morfometria. Amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da aplicação do veneno (tempo 0) e 3, 9 e 15 dias após, para avaliação e monitoração de parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos e plasmáticos. Após 15 dias os animais foram eutanasiados, submetidos a necropsia e amostras de pele ao redor da lesão foram coletadas para posterior análise histológica. Os resultados demonstraram que os animais do GI não apresentaram edema, eritema, halo ou necrose. No primeiro dia da injeção do veneno, após tratamentos com secretoma, os animais do GIII e GIV, apresentaram maior grau de edema, quando comparado aos animais do GII. Todavia, no 15^a dia de avaliação, o edema foi menor nos animais do GIII e GIV e, de forma inversa, maior no GI. O eritema foi observado nos grupos que receberam veneno de *L. intermedia* (GII, GIII e GIV), e comparativamente, no primeiro dia, nos grupos II e III foram similares entre si, e diferentes do GIV que apresentou menor diâmetro de eritema ($p < 0,05$). O halo hemorrágico não foi observado no GI e nos animais que receberam veneno (GII, GIII e GIV), nos tempos 1 e 3, não houve diferença ($p > 0,05$). Deve ser salientado que, no nono dia, somente nos animais do GIV, ainda havia halo hemorrágico. Todavia, macroscopicamente, no GIV, apenas um animal apresentou evolução para ferida dermonecrótica. Na avaliação microscópica, não foram observadas alterações na pele dos animais do GI, entretanto, apesar de todos animais que foram desafiados com o veneno, apresentarem alterações muito semelhantes, como necrose e infiltração heterofílica, no GIV, os animais apresentaram ativação fibroblástica, desenvolvimento precoce de tecido conjuntivo, neovascularização e reepitelização tecidual, conferindo alternativa comprovadamente eficaz em relação ao processo de cicatrização. Em

relação a hematologia não houve alteração digna de nota e na bioquímica sérica, somente houve aumento na concentração de CK no tempo 3, nos grupos GIII e GIV e, posterior redução a partir do nono dia. Esses mesmos grupos também apresentaram aumento de LDH e ureia, porém os valores permaneceram dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie leporina. Conclui-se que a terapia com o secretoma pode ser utilizada na cicatrização da ferida dermonecrótica no loxoscelismo.

Palavras-chave: Loxoscelismo; Araneísmo; Terapia regenerativa.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effects of the secretome, in dermonecrotic wounds in rabbits subjected to injection of *Loxosceles intermedia*. Sixteen male, adult, New Zealand rabbits, with a mean weight of 2.0 kg, were distributed in four groups (n=4). Except for the control group (group I), which was subjected only to the application of secretome (60µg of secretome diluted in 0.5% phosphate-saline buffer), all other groups were subjected to the administration of 10µg of *L. intermedia* venom, diluted in 0.9% NaCl, via intradermal (ID) in the interscapular region and, treated 30 minutes after the venom injection, as follows: group II (NaCl 0.9%, via ID); Group III (60µg of secretome diluted in 0.5% phosphate-saline buffer, via ID) and, group IV (60µg of secretome diluted in 0.5% phosphate-saline buffer intravenous - IV). Animals were evaluated daily and photographic records were taken at a predefined height of 30 cm for later analysis of the evolution of the wound area by morphometry. Blood samples were collected immediately before venom application (time 0) and 3, 9 and 15 days after, for evaluation and monitoring of hematological and serum and plasma biochemical parameters. After 15 days, the animals were euthanized, submitted to necropsy, and skin samples around the lesion were collected for subsequent histological analysis. The results showed that the animals in GI did not have edema, erythema, hemorrhagic halo or necrosis. On the first day of venom injection, after secretome treatments, the animals in GIII and GIV showed a more significant degree of edema, when compared to the animals in GII. However, on the 15th day of evaluation, the edema was lower in the animals of GIII and GIV, and conversely, higher in GI. Erythema was observed in the groups that received *L. intermedia* venom (GII, GIII and GIV), and comparatively, on day 1st, groups II and III were similar to each other, and different from GIV which showed smaller erythema diameter (p<0.05). The hemorrhagic halo was not observed in GI and in the animals that received venom (GII, GIII, and GIV), at times 1 and 3, there was no difference (p>0.05). It should be noted that on the 9th day, only in the animals of GIV, there was still a hemorrhagic halo. However, macroscopically, in GIV, only one animal showed evolution to a dermonecrotic wound. In the microscopic evaluation, no changes were observed in the skin of animals of GI, however, although all animals that were challenged with the venom presented very similar changes, such as necrosis and heterophilic infiltration, in GIV, the animals showed fibroblastic activation, early development of connective tissue, neovascularization, and tissue reepithelialization, conferring a proven effective alternative in relation to the healing process. Regarding hematology, there was no noteworthy change, and in biochemistry serum profile, there

was only an increase in CK concentration at time 3, in groups GIII and GIV, and a subsequent reduction from day 9. These same groups also showed an increase in LDH and urea, but the values remained within the physiological parameters for the leporine species. It is concluded that secretome therapy can be used in dermonecrotic wound healing in loxoscelism.

Keywords: Loxoscelism; Araneism; Regenerative therapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Características das aranhas-marrons. 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 semicírculo indicados com as pontas de setas 24
- Figura 2** Contenção física do animal e injeção endovenosa do secretoma 45
- Figura 3** Pontos de injeção dos grupos experimentais de tratamento 45
- Figura 4** Evolução da ferida dermonecrótica de coelho (GII) após injeção do veneno de *Loxosceles intermedia* e tratamento com NaCl 0,9%. A) Ferida com halo hemorrágico evidente seis horas após a injeção de veneno. B) Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose acinzentada, 72 horas após a injeção do veneno. C) Ferida dermonecrótica com uma crosta bem definida, nove dias após a injeção do veneno. D) Ferida dermonecrótica no último dia de avaliação (15 dias após injeção); observa-se pouca adesão da crosta à pele. 50
- Figura 5** Evolução da ferida dermonecrótica de coelho (GIII) Nova Zelândia após injeção do veneno de *Loxosceles intermedia* e tratamento com secretoma ID. A) Ferida com halo hemorrágico evidente seis horas após a injeção de veneno. B) Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose acinzentada, 72 horas após a injeção do veneno. C) Ferida dermonecrótica com uma crosta bem definida, nove dias após a injeção do veneno. D) Ferida dermonecrótica no último dia de avaliação (15 dias após injeção); observa-se pouca adesão da crosta à pele. 51
- Figura 6** Evolução da ferida dermonecrótica de coelho (GIV) após injeção do veneno de *Loxosceles intermedia* e tratamento com secretoma EV. A) Ferida com halo hemorrágico seis horas após a injeção de veneno. B) Ferida apresentando halo hemorrágico difuso, eritema central e intenso edema, 72 horas após a injeção do veneno. C) Ferida hemorrágico difuso e edema, nove dias após a injeção do veneno. D) Ferida no último dia de avaliação (15º dia) com edema e área esbranquiçada central. 54
- Figura 7** Valores médios \pm desvio padrão do número de eritrócitos $\times 10^6/\mu\text{L}$ de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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. 56
- Figura 8** Valores médios \pm desvio padrão de hemoglobina (g/dL) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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. 56
- Figura 9** Valores médios \pm desvio padrão de volume globular (%) de coelhos tratados com secretoma (GI) e desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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. 57

- Figura 10** Valores médios \pm desvio padrão de VGM (fL) (A) e CHGM (g/DL) (B) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 57
- Figura 11** Valores médios \pm desvio padrão do número absoluto de leucócitos (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D) e plaquetas (E) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 60
- Figura 12** Valores médios \pm desvio padrão de TPPa e TP (segundo) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 62
- Figura 13** Valores médios \pm desvio padrão da concentração creatinaquinase sérica (U/L) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 63
- Figura 14** Valores médios \pm desvio padrão de LDH (U/L) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 64
- Figura 15** Valores médios \pm desvio padrão da concentração de alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) (U/L) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 65
- Figura 16** Valores médios \pm desvio padrão de proteína, albumina e globulina de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 67
- Figura 17** Valores médios \pm desvio padrão da concentração de uréia, creatinina e SDMA de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15° dia após desafio e tratamentos. 68

- Figura 18** Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Nota-se que na epiderme, derme superficial, profunda, se estendendo para hipoderme há áreas multifocais a coalescentes de necrose, perda tecidual com infiltrado inflamatório heterofílico acentuado. 70
- Figura 19** Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Observam-se áreas multifocais de deposição de material basofílico vítreo, evidenciado a mineralização distrófica na avaliação final. 71
- Figura 20** Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se pele normal, sem alterações histológicas nas camadas da pele. 72
- Figura 21** Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se intenso infiltrado inflamatório heterofílico e necrose. 73
- Figura 22** Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se em maior aumento, o intenso infiltrado inflamatório heterofílico e necrose. 73
- Figura 23** Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se fibras colágenas, caracterizando o tecido de granulação. 75
- Figura 24** Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Notam-se tecido de granulação, infiltrado inflamatório heterofílico e angiogênese. 76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Identificação das aranhas pertencentes ao gênero <i>Loxosceles</i> (aranha marrom) no Brasil, até janeiro de 2013.	26
Quadro 2	Principais grupos celulares e mediadores liberados durante a cicatrização tecidual.	38
Tabela 1	Distribuição dos animais nos diferentes grupos e protocolos de tratamento após injeção do veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> .	44
Tabela 2	Valores das medianas \pm amplitude de eritema de coelhos tratados com secretoma (GI) e desafiados com veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> 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.	52
Tabela 3	Valores médios \pm desvio padrão de edema, halo hemorrágico e necrose de coelhos tratados com secretoma (GI) e desafiados com veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CID - Coagulação intravascular disseminada

CHGM – Concentração de hemoglobina globular média

CK – Creatinaquinase

CK-MB- Fração MB de creatinaquinase

CTGF- Fator de crescimento do tecido conjuntivo

CTMs- Células-tronco mesenquimais

EDTA- Ácido etilenoaminotetracético

EGF- Fator de crescimento epidermal

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

FA - Fosfatase alcalina

FGF- Fator de crescimento fibroblástico

HE- Hematoxilina-Eosina

HGM- Hemoglobina globular média

HR- Hialuronidase recombinante

IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina-1

IL-1- Interleucina-1

IL-2- Interleucina-2

IL-4- Interleucina-4

IL-6- Interleucina-6

IL-8- Interleucina-8

INF- α - Interferon- α

KGF- Fator de crescimento de queratinócito

LAMACA- Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal

LDH- Lactato desidrogenase

MCP-1- Proteínas quimioatraentes de macrófagos-1

MEP- Matriz extracelular provisória

MMP- Metaloproteinases da matriz

PAF- Fator ativador de plaquetas

PBS- *Phosphate-Buffered Saline*

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

RDW-CV e RDW-SV - Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos

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

SITC- Sociedade Internacional para Terapia Celular

SMase D - Esfingomielinase D

SITC - Sociedade Internacional para Terapia Celular

TIMP- Fator inibidor tecidual das metaloproteinases da matriz

TCTP - Proteínas tumorais controladas de forma translacional

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

TP- Tempo de protrombina

TTPa- Tempo de Tromboplastina Parcial ativada

VEGF-A- Fator de crescimento endotelial vascular

VGM- Volume Globular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Geral	23
2.2 Específicos.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 Loxosceles sp.....	24
3.1.1 Aspectos biológicos	24
3.1.2 Veneno	27
3.1.3 Sinais clínicos.....	28
3.2 Abordagem Terapêutica	33
3.2.1 Terapia Celular	35
3.2.2 Secretoma	36
3.3 Fisiopatologia da cicatrização de feridas.....	37
3.3.1 Fase de hemostasia	39
3.3.2 Fase inflamatória e desbridamento	39
3.3.3 Fase Proliferativa.....	40
3.3.4 Fase de Maturação e Remodelamento	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Seleção dos animais.....	43
4.2 Obtenção do veneno e secretoma de células-tronco mesenquimais	43
4.3 Grupos experimentais	43
4.4 Injeção do veneno e tratamento com secretoma.....	44
4.5 Coletas de sangue e análises laboratoriais	46
4.6 Avaliação da área das lesões	46
4.7 Avaliação histopatológica das lesões	47
4.8 Análises estatísticas	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Seleção dos animais e dose inoculada de veneno.....	49
5.2 Avaliações de dermonecrose	49
5.3 Avaliações hematológicas	55

5.4 Coagulograma.....	61
5.5 Bioquímica sérica	62
5.6 Avaliação histopatológica	69
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas popularmente por aranhas marrons, possuem distribuição mundial e já foram descritas nas Américas, Europa, Ásia, África e Oceania. Dentre os acidentes causados por aranhas no Brasil, 40% são causados por *Loxosceles* spp. (Andrade *et al.*, 2005; Malaque *et al.*, 2002), sendo as espécies de maior importância, do ponto de vista médico e veterinário, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Cordeiro *et al.*, 2015).

O termo loxoscelismo é empregado para caracterizar um conjunto de manifestações clínicas provocadas pela injeção do veneno de aranha do gênero *Loxosceles*. Dois quadros de loxoscelismo são os mais comuns: (1) a forma cutânea, que provoca reações locais e ferida dermonecrotica com propagação gravitacional de difícil cicatrização, e (2) a forma cutâneo-visceral que leva a manifestações de insuficiência renal e distúrbios hematológicos como coagulação intravascular disseminada (CID) e hemólise intravascular (Da Silva *et al.*, 2004; Tambourgi *et al.*, 2010; Chaim *et al.*, 2011). Os sinais cutâneos manifestam inicialmente no local da picada através de efeitos diretos e degenerativos dos componentes do veneno sob a membrana basal e matriz extracelular das células, resultando em danos drásticos ao tecido (Futrell *et al.*, 1992).

No Brasil, os acidentes causados por *Loxosceles* spp. são de notificação obrigatória na medicina humana (Hogan *et al.*, 2004). Eles representam 33% das 100.054 dos acidentes notificados ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde), entre 2017 e 2021. Todavia, na medicina veterinária, os dados referentes aos acidentes causados por *Loxosceles* spp. ainda são escassos. Entretanto, observa-se um aumento do número de casos nas clínicas e hospitais veterinários, especialmente em cães, que pode ser explicado pela atual criação intradomiciliar da maioria dos animais de estimação (Collacio *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009).

Diferentemente da medicina humana, na veterinária não há tratamento específico com soro antiloxoscélico (Melo *et al.*, 2004; Collacio *et al.*, 2008). O tratamento é instituído de acordo com os sinais clínicos observados, incluindo antibióticos de amplo espectro, corticosteroides, dapsona e ácido acetilsalicílico (Da Silva *et al.*, 2004; Peterson, 2006; Ministério Da Saúde, 2019).

Ainda existem muitas contradições em relação à terapia mais eficaz no tratamento de lesões dermonecroticas decorrentes de acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles*. Há muitos estudos experimentais avaliando diversas terapias, contudo, os resultados são diferentes e

inconclusivos quanto à melhor terapia, especialmente quando se refere à resolução da ferida dermonecrótica (Maynor *et al.*, 1997; Hogan *et al.*, 2004; Swanson e Vetter, 2006). A baixa eficácia do tratamento tem sido atribuída à incompreensão de todos mecanismos de ação do veneno de *Loxosceles* (Barbaro *et al.*, 2010).

São relatadas terapias que incluem: oxigênio hiperbárico (Phillips *et al.*, 1995; Maynor *et al.*, 1997); anti-histamínicos incluindo a ciproheptadine (Phillips *et al.*, 1995), excisão cirúrgica da ferida (Rees *et al.*, 1985), corticosteroide (Rees *et al.*, 1985), soro antiloxoscélico (Pauli *et al.*, 2006), antibioticoterapia e dapsona (Rees *et al.*, 1985; Barret *et al.*, 1994; Phillips *et al.*, 1995; Elston *et al.*, 2005). Portanto, a proposta do uso de células-tronco é promissora, visto que seu uso em terapias regenerativas e reparativas está sendo cada dia mais estudado na clínica médica e cirúrgica (Fortier, 2005).

Existem boas expectativas para uso de células-tronco-mesenquimais no tratamento de lesões cutâneas, visto que ensaios experimentais evidenciaram que essas células possuem a capacidade de acelerar o processo de cicatrização dos tecidos, através da sua diferenciação em alguns tipos celulares importantes nos processos cicatriciais, e por efeito parácrino promover estímulos de proliferação fibroblástica e estimular angiogênese, o que resulta no aumento da velocidade de cicatrização de lesões (Hocking e Gibran, 2010; Kim *et al.*, 2013; Martins, 2014). De acordo com Scadden (2006), as células-tronco mesenquimais atuam nas lesões primariamente reduzindo a inflamação e no aumento da angiogênese, induzindo a proliferação e migração celular, como também detecção da expressão gênica de outras células presentes no ambiente em que ocorreu a lesão.

Portanto, pensando na melhora da qualidade de vida do paciente e também na cicatrização da grave ferida que ocorre no loxoscelismo, a busca por terapias mais inovadoras e eficazes é de extrema importância na medicina veterinária, visto a gravidade, extensão e difícil cicatrização provocadas pelas lesões dermonecróticas.

Dentro desse cenário, estudos recentes revelaram que o secretoma, composto de moléculas tróficas liberadas pelas células-tronco mesenquimais, desempenham um papel importante na regulação dos principais processos biológicos e podem apresentar vantagens consideráveis sobre as células para produção, armazenamento, manuseio, como um produto biológico pronto para uso. Com tantas vantagens, e ainda pouco explorado na literatura, esse é um campo que pode dar bons resultados para tratamento de lesões cutâneas graves como as causadas por *Loxosceles* spp.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a cicatrização de lesões dermonecróticas causadas pela injeção de veneno de *Loxosceles intermedia*, após tratamento com o secretoma.

2.2 Específicos

Avaliar a cicatrização de lesões dermonecróticas causadas pelo veneno de *L. intermedia*, após tratamento com secretoma, por via intradérmica e endovenosa.

Estudar o perfil sanguíneo, hemostático e bioquímico sérico e plasmático de coelhos inoculados com veneno de *L. intermedia*, após tratamento com secretoma, por via intradérmica e endovenosa.

Realizar análise anátomo-histológica de lesões dermonecróticas causadas pelo veneno de *L. intermedia*, após tratamento com secretoma, por via intradérmica e endovenosa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Loxosceles* sp.

3.1.1 Aspectos biológicos

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família das aranhas *Sicariidae*. Dentro dessa família compreendem os gêneros: *Hexophthalma*, com seis espécies na África; *Sicarius*, com 21 espécies presentes na América do Sul e Central; e *Loxosceles* com 139 espécies descritas no mundo todo (Magalhães *et al.*, 2017; World Spidercatalog, 2020).

Todas as espécies de *Loxosceles* são comumente conhecidas por “aranhas marrons” ou aranhas “violino”. Sua coloração varia de marrom claro a marrom escuro (Figura 1B), o que pode facilitar a identificação de algumas espécies, como a *L. laeta*, que possui no cefalotórax tem uma mancha escura. São pequenas e possuem um tamanho corporal médio entre 8 e 15mm de comprimento e três pares de patas alongadas e finas que alcançam 30mm (Vetter, 2008; Magalhães *et al.*, 2017). As aranhas *Loxosceles* possuem evidente dimorfismo sexual: os machos comparados as fêmeas possuem o corpo menor e patas mais alongadas (Figura 1A). Apresentam seis olhos em pares, sendo um par frontal e outros dois laterais (Malaque *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004).

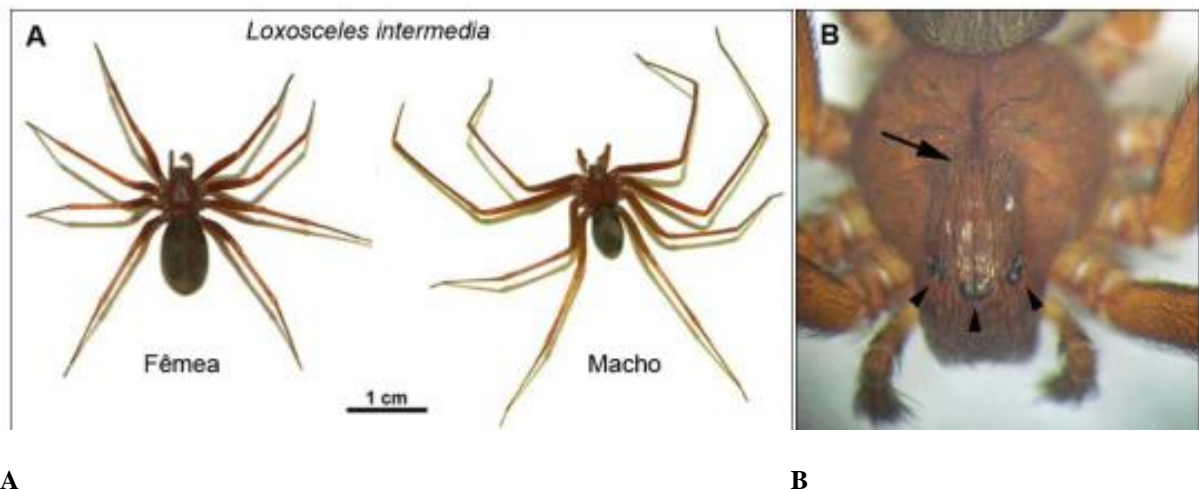


Figura 1 - CARACTERÍSTICAS DAS ARANHAS-MARRONS. A – Dimorfismo sexual de *L. intermedia*. Fêmea com corpo maior e pernas menores que as do macho. B – Em destaque o desenho de violino no cefalotórax indicado pela seta e os três pares de olhos distribuídos em semicírculo indicados com as pontas de setas.

Fonte: Adaptado de: Chaim *et al.*, (2011).

São aranhas de pequeno porte com tamanho corporal médio entre 8 a 15 mm de comprimento e patas alongadas que chegam a 30 mm. Apresentam dimorfismo sexual, sendo que

o macho tem o corpo menor e patas mais longas que as das fêmeas. Algumas características específicas auxiliam na sua identificação, como o formato do cefalotórax semelhante à um violino, e a disposição dos seis olhos, em pares, com um par frontal e outros dois laterais (Malaque *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004). São aranhas caracteristicamente pouco agressivas, sedentárias, de hábitos noturnos e, a maioria dos acidentes relatados, são pressionadas acidentalmente contra o corpo (Malaque *et al.*, 2002). Podem viver na natureza por até sete anos e são encontradas sob madeiras, cascas de árvores, folhas caídas, sobre pedras, madeira e cavernas (De Andrade *et al.*, 2000; Tambourgi *et al.*, 2010) e encontram-se também em locais intradomiciliares como despensas, móveis e porões (Machado *et al.*, 2009).

A maioria das espécies do gênero *Loxosceles* são descritas na América Central, América do Sul e África, são menos frequentes na América do Norte e, há registros muito limitados na Ásia e Europa (World Spider Catalog, 2020). Portanto, são aranhas encontradas por todo o mundo, detectadas em ambiente com grande variação térmica entre 8 a 43°C (Silva *et al.*, 2004; Silvestre *et al.*, 2005; Platnick, 2013).

Diferentes grupos de espécies são classificadas, tradicionalmente, com base na morfologia das aranhas: na América do Norte está presente a *L. reclusa* (Gertsch e Ennik, 1983); na América do Sul são encontradas *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. amazonica*, *L. spacicea* e *L. intermedia*; já na África do Sul foram descritas a *L. vonwredei* e *L. spinulosa* (Newlands e Atkinson, 1988); e no Mediterrâneo a *L. rufescens* (Nentwig *et al.*, 2017). Recentemente, aranhas da espécie *L. amazonica* foi sinonimizada com a *L. rufescens* (Duncan *et al.*, 2010; Fukushima *et al.*, 2017; Valdez-Mondragon *et al.*, 2019). No território brasileiro de acordo com Platnick, (2013) já foram identificadas 19 espécies (Quadro 1) sendo as de maior importância, do ponto de vista médico e veterinário, *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Cordeiro *et al.*, 2015).

Quadro 1 - Identificação das aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* (aranha marrom) no Brasil, até janeiro de 2013.

Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> identificadas no Brasil:
<i>Loxosceles adelaida</i>
<i>Loxosceles amazônica</i>
<i>Loxosceles anômala</i>
<i>Loxosceles cardosoi</i>
<i>Loxosceles carinhanha</i>
<i>Loxosceles chapadensis</i>
<i>Loxosceles ericsoni</i>
<i>Loxosceles gaúcho</i>
<i>Loxosceles hirsuta</i>
<i>Loxosceles imodesta</i>
<i>Loxosceles karstica</i>
<i>Loxosceles intermedia</i>
<i>Loxosceles laeta</i>
<i>Loxosceles muriciensis</i>
<i>Loxosceles niedeguidonae</i>
<i>Loxosceles puortoi</i>
<i>Loxosceles similis</i>
<i>Loxosceles troglobia</i>
<i>Loxosceles willianilsoni</i>

Fonte: Platnick, 2013.

Embora exista uma ampla distribuição dessas aranhas pelo mundo, os casos clínicos de loxoscelismo são mais relatados nas Américas, particularmente no Brasil, onde o número de envenenamentos aumentou consideravelmente nos últimos anos. No ano de 2020, o Ministério da Saúde apontou 6.819 casos de loxoscelismo em humanos, sendo que, desses, 11 vieram a óbito

e, somente no Sul do país, houve 3.144 relatos de acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* e seis mortes no mesmo ano (Ribeiro *et al.*, 2020; Brasil, 2021).

Acidentes causados por *Loxosceles* spp. no Brasil, são de notificação obrigatória (Hogan *et al.*, 2004) e representam 33% das 100.054 dos acidentes notificados ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde), entre 2017 e 2021. A maioria dos acidentes ocorre nas regiões Sul e Sudeste, principalmente no estado do Paraná, que possui o maior número de acidentes notificados. Em Minas Gerais foram notificados 446 acidentes em humanos envolvendo *Loxosceles* spp. no ano de 2020 (Brasil, 2021).

Os dados na medicina veterinária referentes a acidentes por *Loxosceles* spp. ainda são escassos, entretanto vem sendo observado um aumento dos casos de loxoscelismo, especialmente, em cães, semelhante aos casos humanos, que pode ser explicado pela criação intradomiciliar da maioria dos animais de estimação (Collacico *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009).

3.1.2 Veneno

As aranhas marrons são artrópodes que utilizam na natureza seu veneno para predação e defesa. Da glândula de uma aranha adulta podem ser extraídos, aproximadamente, 2 μ L de um líquido claro altamente viscoso contendo cerca de 50 μ g de proteínas. O veneno bruto é uma substância altamente complexa apresentando numerosas enzimas e proteínas que provocam efeitos nocivos em mamíferos (Moura, 2005). Segundo Chaves-Moreira *et al.* (2017) as características de toxicidade do veneno de *Loxosceles* são muito semelhantes entre gêneros femininos e masculinos e entre as diferentes espécies, como *L. laeta*, *L. reclusa*, *L. intermedia*, *L. adelaida*, *L. similis* e *L. gaucho*.

Estudos revelam a presença de fosfolipase-D, hialuronidase, metaloproteases, serinoproteases, esterase, lipases, fosfatase alcalina e 5'-rinobonucleotideo-fosfohidrolase, inibidores da família de peptídeos de nó de cistina, alérgenos/toxinas semelhantes, efetores de liberação de histamina (Veiga *et al.*, 2000; Da Silveira *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Peterson, 2006; Kalapothakis *et al.*, 2007). Sugere-se que a toxicidade relevante *in vivo* do veneno da aranha marrom, seja constituída por proteínas dermonecróticas de massa molecular de aproximadamente 35kDa. Evidencia-se dentre as enzimas dermonecrótica, a mais abundante é a esfingomielinase D (SMase D), que é capaz de catalisar e hidrolisar a esfingomielina formando a ceramida-fosfato e colina, provando lesões dermonecróticas, hemólise e agregação plaquetária (Andrade *et al.*, 2005; Ferrara *et al.*, 2009). Foi proposta uma classificação das esfingomielinases

D sequenciadas e isoladas, baseando-se na identidade sequencial na atividade bioquímica e no modelo molecular, tendo em vista as particularidades das pontes dissulfeto. A classe 1, obtida da *L. laeta*, correspondem as SMase 1 e SMase 2 (Ferrara *et al.*, 2009). A classe 2, adquirida da *L. intermedia*, compreendem as SMases D P1 e P2 e, isoladas da *L. reclusa*, são as SMases D Lr1 e Lr2 (Murakami *et al.*, 2006).

De acordo com Feitosa *et al.* (1998), outro componente importante do veneno são as proteases, conhecidas por atuar como fatores hemorrágicos. Foram identificados no veneno de *L. intermedia*, duas metaloproteases, nominadas de Loxolisina A, que tem ação fibrinogenolítica e, Loxolisina B com ação gelatinolítica, sendo responsáveis por distúrbios hemostáticos que ocorrem neste envenenamento. Também foram identificados no veneno bruto, membros da família de proteínas tumorais controladas de forma translacional (TCTP), que possuem ação de liberação de histamina, o que provavelmente se relaciona com o eritema provocado, difusão do veneno, prurido, dor e, raramente casos de hipersensibilidade e reações alérgicas (Sade *et al.*, 2012; Boia-Ferreira *et al.*, 2019).

Em relação à hialuronidase presente no veneno de *Loxosceles*, foram identificadas três isoformas (Da Silveira *et al.*, 2007; Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). Essas possuem ação de potencializar as demais enzimas presentes no veneno, provocando uma degradação da matriz extracelular, causando uma hidrólise do tecido conjuntivo e degradação do ácido hialurônico. Em um estudo realizado por Ferrer *et al.* (2013) em pele de coelhos com hialuronidase recombinante (HR), evidenciou-se indução de toxicidade local quando administrada HR com a toxina dermonecrótica recombinante.

Todavia, ainda permanece desconhecido o mecanismo detalhado da ação do veneno, mas, sabe-se que esse é formado por várias centenas de substâncias biologicamente ativas que atuam sinergicamente. O consenso, até o momento, é que, as isoformas de fosfolipase D presentes no veneno, são responsáveis pela patologia do envenenamento em mamíferos (Fingermann *et al.*, 2020).

3.1.3 Sinais clínicos

O termo loxoscelismo é empregado para caracterizar um conjunto de manifestações clínicas provocadas pela injeção do veneno da aranha marrom, que pode desenvolver-se como a forma cutânea e cutânea-visceral (Tambourgi *et al.*, 2010; Isbister e Fan, 2011). A picada geralmente é indolor e a vítima não apresenta sinais ou sintomas evidentes nas primeiras horas, o que leva a um atendimento médico tardio, geralmente após 24 horas após o envenenamento. Portanto, é difícil ocorrer um diagnóstico preciso de loxoscelismo, assim como os sintomas

clínicos podem ser confundidos com infecções virais ou bacterianas, úlceras provocadas por diabetes, dermatites ou vasculites (Vetter e Isbister, 2008). O diagnóstico se dá na maioria das vezes de forma presuntiva, por meio dos sinais clínicos apresentados em conjunto com o histórico.

Após as primeiras horas do acidente, os pacientes relatam dor no local da picada e prurido, e aparecem eritema, edema, áreas de hemorragia e necrose grave (Malaque *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Tambourgi *et al.*, 2010). A lesão comumente evolui para úlcera de difícil cicatrização e geralmente apresenta sensibilidade dolorosa (Isbister e White, 2004; Peterson, 2006).

A forma cutânea é prevalente em 80% dos casos de loxoscelismo, identificando-se uma grave ferida dermonecrotica de propagação gravitacional. A forma cutâneo-visceral ou sistêmica é a manifestação mais grave que está presente na minoria dos animais e que pode evoluir para óbito (Malaque *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2005). As alterações clínicas no local da picada são muito semelhantes nas duas apresentações (Isbister e White, 2004). Diferentes fatores são importantes para determinar a intensidade dos sinais clínicos após a picada da *Loxosceles* spp, dentre eles são importantes o volume de veneno inoculado, local de injeção, idade da vítima, comorbidades e características genéticas (Sezerino *et al.*, 1998; De Andrade *et al.*, 1999; Barbaro *et al.*, 2005).

3.1.3.1 Sinais clínicos cutâneos

Os sinais clínicos cutâneos ocorrem na maioria dos casos. As toxinas do veneno responsáveis por esses efeitos locais variam de pequenas áreas de eritema à grandes ulcerações e necrose, tanto em humanos quanto em modelos experimentais animais (Martins, 2014). Em estudos realizados em coelhos foram observados às mesmas lesões vistas em biópsias de pele de humanos, evidenciando dermonecrose com infiltração maciça de células inflamatórias na derme (Barbaro *et al.*, 1992; Ospedal *et al.*, 2002; Martins, 2014). Segundo Silva *et al.* (2004) tem-se o diagnóstico de loxoscelismo cutâneo, se dentro de 24 horas não forem observados sinais clínicos loxoscelismo cutâneo-visceral.

A dermonecrose é a principal característica do envenenamento provocado por *Loxosceles*, que se manifesta inicialmente por efeitos diretos e degenerativos causados pelos constituintes do veneno sobre a membrana celular, membrana basal e matriz extracelular, provocando danos drásticos ao tecido (Futrell, 1992). Os sinais clínicos do loxoscelismo cutâneo iniciam-se com edema e eritema em até seis horas após a picada, evoluindo em aproximadamente, 24 a 36 horas, para uma área de equimose. A lesão necrótica alcança área máxima, desenvolvendo-se uma crosta seca, que, geralmente, está associada a infecção bacteriana secundária, após cinco a sete

dias ao envenenamento. Posteriormente, em média, duas a três semanas após o acidente, a crosta necrótica cai, formando uma área de ulceração (Cacy e Mold, 1999; Delasotta *et al.*, 2014).

A fosfolipase D é a enzima de maior importância na dermonecrose, pois promove uma interação com a membrana celular desencadeando reações que envolvem o sistema complemento, plaquetas e leucócitos (Silva *et al.*, 2004, Barbaro *et al.*, 2005; Isbister e Fan, 2011). Estudos sugerem que o evento inicial para a formação da lesão é a trombose da microvasculatura (Elston *et al.*, 2000). Uma pesquisa realizada por Smith e Micks (1970), demonstrou o papel fundamental dos polimorfonucleares no desenvolvimento da inflamação e necrose, pois, a depleção de seus componentes em cobaias inibiu sintomas como hemorragia e infiltração de leucócitos, além de diminuir acentuadamente o edema local.

3.1.3.2 Sinais clínicos sistêmicos

A apresentação do loxoscelismo cutâneo visceral é a menos comum, ocorrendo em aproximadamente 15% dos casos. Além da manifestação cutânea, esses pacientes apresentam manifestações sistêmicas, incluindo choque, icterícia, trombocitopenia, leucocitose, hemólise intravascular associada à hematúria e hemoglobinúria e insuficiência renal aguda (Sezerino *et al.*, 1998; Malaque *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 2004; Malaque *et al.*, 2011). Fatalidades são raras, mas podem ocorrer frequentemente em idosos, crianças ou quando evoluem para insuficiência renal aguda e distúrbios hematológicos graves (Cacy e Mold, 1999; Da Silva, 2004; Lucato *et al.*, 2011; Delasotta *et al.*, 2014). Segundo Silva *et al.* (2003) as reações hemolíticas podem variar entre espécies na susceptibilidade aos efeitos do veneno, por exemplo, os coelhos aparentemente não apresentam nenhuma reação hemolítica quando comparados a humanos, suínos e ratos.

Foi relatado que acidentes envolvendo aranhas da espécie *Loxosceles laeta* levam, com maior frequência, ao aparecimento de lesões sistêmicas (Schenone *et al.*, 1989), diferentemente quando ocorrem acidentes com aranhas das espécies *L. gaucho* (Malaque *et al.*, 2002) e *L. reclusa* (Wright *et al.*, 1997; Mcdade *et al.*, 2010; Rosen *et al.*, 2012), nos quais observa-se uma menor frequência do quadro sistêmico.

Algumas horas após o envenenamento, o veneno pode promover agregação plaquetária e trombocitopenia, em consequência ao consumo intenso de plaquetas no local da lesão, além de uma provável ação direta e transitória na medula óssea (Silva *et al.*, 2003; Tavares *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2009). Segundo Tavares *et al.* (2004) é um evento incomum a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID), e a sua patogenia ainda não está bem elucidada.

Para a avaliação do leucograma é importante avaliar o tempo de coleta do sangue e também da dose aplicada de veneno, pois o número de leucócitos é variável (Silva *et al.*, 2003; Mcglasson, *et al.*, 2007, Malaque *et al.*, 2011). Estudos realizados por Silva *et al.* (2003) evidenciaram que após as primeiras 24 horas da injeção do veneno de *L. intermedia*, ocorreu intensa leucopenia em coelhos. A neutropenia instala-se horas após o acidente, devido à abundante migração de neutrófilos para o tecido, de forma transitória. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados por Mcglasson *et al.* (2007) após injeção de veneno de *L. laeta* em coelhos, entretanto devendo ser salientado que 72 horas após, verificou-se uma severa leucocitose.

Também são observados outros sintomas não específicos no loxocelismo sistêmico em humanos, tais como, febre, êmese, cefaléia e insônia, alterações sensoriais, astenia, prurido generalizado, petéquias, e, em casos mais graves, convulsões e coma (Schenone *et al.*, 1989; Futrell, 1992; Isbister e Fan, 2011; Rosen *et al.*, 2012).

São relatadas reações sistêmicas de hipersensibilidades causadas por envenenamento de *L. reclusa* e *L. rufescens*, geralmente em indivíduos atópicos levando a um quadro de exantema pustuloso generalizado. O quadro cursa com pele eritematosa, pústulas estéreis e, comumente com febre e leucocitose (Pippirs *et al.*, 2009).

Em estudos realizados em camundongos, foi relatada que, quatro horas após a injeção do veneno de *L. intermedia*, houve aumento da atividade da enzima creatina fosfoquinase (CK) e sua fração MB (CK-MB) (Lopes *et al.*, 2010) e, seis horas após, elevação das enzimas hepáticas (Christoff *et al.*, 2008) sinalizando, possível ação do veneno nesses tecidos. Segundo Tavares *et al.* (2004) pode ocorrer também a formação de trombos e, conseqüentemente, a diminuição do aporte sanguíneo para órgãos vitais, ocasionando danos drásticos a estes órgãos, com sinais clínicos associados.

Pesquisas revelaram a presença de antígenos de *L. intermedia* nos rins (Luciano *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2006), coração (Lopes *et al.*, 2010), pulmões e fígado (Christoff *et al.*, 2008) de camundongos envenenados experimentalmente. De acordo com Luciano *et al.* (2004), o veneno de *L. intermedia* possui ligação direta com as estruturas renais de camundongos, através de uma isoforma da enzima fosfolipase D capaz de provocar alterações na estrutura renal, com efeito citotóxico dependente de sua atividade catalítica.

A causa mais comum de óbito no loxocelismo é a insuficiência renal aguda, que pode estar relacionada com a injúria renal direta, com o depósito de hemoglobina nos túbulos renais advindos da intensa hemólise intravascular, e pela ação direta do veneno causando edema

glomerular e nefrose tubular (Malaque *et al.*, 2002; Chaim *et al.*, 2006; Tambourgi *et al.*, 2010; Malaque *et al.*, 2011). Os achados laboratoriais evidenciaram aumento de ureia e creatinina, proteinúria, hematúria e hemoglobinúria (Chaim *et al.*, 2006).

3.1.3.3 Alterações histopatológicas

Acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* spp. geralmente cursam com feridas dermonecroticas com propagação gravitacional e de difícil cicatrização. As alterações obtidas nos exames histológicos são variáveis de acordo com o tempo da injeção do veneno para a coleta do material. O intenso infiltrado neutrofílico é tido como o principal causador das feridas dermonecroticas (Elston *et al.*, 2000).

Estudos avaliando achados microscópicos de lesões em humanos em acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles*, revelam abundante infiltrado inflamatório, trombose, hemorragia, dermatite, inflamação aguda, eritema, liquefação e necrose da epiderme e derme consistentes com casos de pioderma gangrenoso (Futrell, 1992; Yiannias e Winkelmann, 1992). Nas pesquisas realizadas com modelos experimentais animais, utilizando diferentes espécies de aranhas marrons, os achados patológicos são similares aos que ocorrem em humanos.

Elston *et al.* (2000) avaliaram microscopicamente, amostras de tecido cutâneo de coelhos 14 dias após envenenamento experimental com veneno de *L. reclusa*, sendo os principais achados: infiltrado misto de células inflamatórias composto predominantemente por neutrófilos, necrose de coagulação da epiderme e derme e vasculite. Todos os animais apresentavam na epiderme e derme, uma zona bem delineada de coloração eosinofílica, como uma necrose coagulativa e, uma quantidade massiva de neutrófilos delimitando a zona de necrose.

De acordo com Ospedal *et al.* (2002), após a utilização de veneno de *L. intermedia* em coelhos, houve deposição de rede de fibrina intravascular e trombose nos vasos presentes da derme, degeneração na parede do vaso sanguíneo e infiltração massiva e agregação de células inflamatórias. Também foi relatado infiltrado de neutrófilos e leucócitos no músculo esquelético, edema muscular e mionecrose de algumas miofibrilas. Outras pesquisas também descreveram a ocorrência de destruição da epiderme, com necrose de coagulação na epiderme e derme (Elston *et al.*, 2000; Ospedal *et al.*, 2002, Silva *et al.*, 2004). A inflamação é um achado frequente, sendo relatada a liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina 6 (IL-6) e MPC-1, em patas de camundongos (Barbaro *et al.*, 2010).

Alterações histológicas de outros órgãos em camundongos, após envenenamento experimental com *L. intermedia*, são mais expressivas no rim. Foi relatada necrose tubular aguda

em vários néfrons, acompanhada por deposição de material eosinofílico nos túbulos proximais e distais (Tambourgui *et al.*, 1998).

Foi visto que o veneno *L. intermedia* também causa importante efeito cardiotoxico e que pode ter um papel significativo nos sintomas do loxoscelismo sistêmico. As proteínas da família Loxtox desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de disfunção cardíaca em camundongos envenenados (Dias-Lopes *et al.*, 2010).

3.2 Abordagem Terapêutica

Apesar de existir uma vasta literatura sobre loxoscelismo, os tratamentos adequados para as feridas dermonecroticas ainda permanecem controversos. Em 2001, Samse e colaboradores propuseram uma classificação das lesões locais, com o tratamento utilizado podendo variar de acordo com a gravidade do quadro, usando como critérios principalmente a ausência ou presença de necrose e sua extensão. Na medicina humana, de acordo com essa classificação, para lesões brandas, o tratamento inclui gelo, compressão, elevação do membro afetado e utilização de anti-histamínico. Para lesões moderadas, são usados analgésicos, antibióticos e dapsona. Para as lesões mais graves, terapias de suporte são necessárias como o uso de esteróides sistêmicos, desbridamento cirúrgico, enxerto de pele, oxigenoterapia hiperbárica e quando possível o soro antiloxoscélico (Swanson e Vetter, 2005).

Dentro desses protocolos terapêuticos, Lopes *et al.* (2020) realizaram uma revisão entre os tratamentos do loxoscelismo cutâneo mais comuns e/ou promissores relatados na literatura e demonstraram que os mais utilizados são os antibióticos (66%), seguido de corticosteroides (35%), transfusão sanguínea (23%), desbridamento cirúrgico (13%), anti-histamínicos (11%) e dapsona (9%). Outras terapias como soro antiloxoscélico e oxigênio hiperbárico são utilizadas em menos de 3% dos casos analisados.

Na grande maioria dos casos de lesões dermonecroticas advindas do loxoscelismo, são utilizados os antibióticos (Gremski *et al.*, 2014). O uso dessa alternativa terapêutica é importante para a prevenção de infecções secundárias, e o uso concomitante com agentes antissépticos, como por exemplo, a limpeza com a iodopovidona, demonstram boa eficácia (Farace *et al.* 2006; Cachia *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2020). Entre os antibióticos utilizados, a tetraciclina de uso tópico, pode reduzir a progressão da lesão dermonecrotica, devido às suas atividades antiinflamatórias e imunomoduladoras (Tambourgui *et al.*, 2010; Rubenstein *et al.*, 2016).

A utilização de corticosteroides é comumente administrada para retardar a formação de úlceras e amenizar os efeitos sistêmicos da picada (Swanson e Vetter, 2005). Em coelhos, os

efeitos sistêmicos do veneno podem ser bloqueados com os glicocorticóides, quando aplicado até oito horas após a picada pela aranha (Dillaha *et al.*, 1964). A melhor atuação dos corticosteroides nos casos sistêmicos ocorre em decorrência do seu mecanismo imunossupressor, sua ação protetora da membrana das hemácias, diminuindo a hemólise intensa que ocorre nessa síndrome (Peterson, 2006).

A dapsona, um antibiótico sulfônico, tem sido recomendada como tratamento para feridas dermonecroticas ocasionadas pelo loxoscelismo devido à ação de inibir a degranulação polimorfonuclear e conseqüentemente reduzir a inflamação local (Martins, 2014). Porém seu uso é controverso, pois a dapsona pode causar vários efeitos colaterais incluindo erupções cutâneas e hemólise, agindo assim como um fator de confusão dos sintomas de loxoscelismo sistêmico (Rubenstein *et al.*, 2016).

Já a transfusão é necessária em casos de anemia hemolítica grave, não sendo raros os pacientes que necessitam dessa intervenção (Lopes *et al.*, 2020). Outro tratamento comumente utilizado é o desbridamento cirúrgico, porém essa ação quando executada de modo precoce pode aumentar a área inflamatória e agravar os efeitos do veneno. Essa cirurgia é aconselhável apenas para feridas estabilizadas com cicatrização prolongada ou perda permanente do tecido (Pauli *et al.*, 2006).

O soro antiloxoscélico é o único tratamento específico para neutralizar a ação do veneno. Gomez *et al.* (1999) documentaram a eficácia do soro intradérmico administrado em coelhos dentro de quatro horas após a injeção, porém a dermonecrose não é atenuada se o soro antiloxoscélico for administrado mais de oito horas após a injeção do veneno, sendo essa situação agravada pelo fato do produto não ser comercialmente disponível. Na rotina clínica isso é um grave problema, pois a maioria dos casos se apresentam após esse período, e a partir desse momento o soro antiloxoscélico pode não ser mais eficaz (Martins, 2014).

A possível efetividade da terapia com oxigênio hiperbárico está baseada no seu mecanismo de ação que promove uma neovascularização tecidual com o aumento de aporte de oxigênio para o tecido isquêmico. Isso ocorre, porque o efeito tóxico do oxigênio afeta diretamente as bactérias anaeróbias (Davanzo *et al.*, 2016). Além disso, a atividade de alguns antibióticos aumenta quando exposto ao oxigênio (Cetinkaya *et al.*, 2020).

Entretanto, é importante ressaltar que todos esses tratamentos ainda são questionáveis, pois podem ser caros, dolorosos e/ou tóxicos. Nenhuma modalidade de tratamento foi encontrada associada a um menor tempo de cicatrização ou menor aparecimento de cicatrizes após os tratamentos (Rubenstein *et al.*, 2016).

3.2.1 Terapia Celular

As células-tronco são células não especializadas do corpo humano, capazes de se diferenciar em qualquer célula de um organismo (Fortier, 2005). São células que existem tanto em embriões quanto em células adultas, e podem ser classificadas em células-tronco totipotentes, que tem a capacidade de formar um organismo inteiro; pluripotentes, capazes de originar tecidos de todas as origens embrionárias, e células-tronco multipotentes, capazes de formar linhagens celulares mais específicas (Zakrzewski *et al.*, 2019).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células estromais multipotentes não hematopoiéticas que foram isoladas de vários locais de tecidos adultos, como por exemplo medula óssea (Nemeth e Mezey, 2015), tecido adiposo (Toyserkani *et al.*, 2015) e membranas fetais (Kern *et al.*, 2006).

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

A partir dessas características das CTMs e com o intuito de promover uma padronização, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (SITC) definiu critérios mínimos para a classificação das CTMs. Em primeiro lugar a propriedade as células devem aderir ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão. Devem apresentar multipotência *in vitro* o que reflete a capacidade de diferenciar nas células de origem mesenquimal em condições adequadas. Ter um 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).

No geral, há quatro maneiras da utilização de CTMs, sendo o implante local dessas células, para 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 CTMs e sua potencial aplicação na terapia regenerativa para um amplo espectro de doenças, incluindo várias doenças autoimunes e inflamatórias (Li *et al.*, 2021).

Entretanto, um dos maiores desafios da utilização da terapia celular são as variações na eficácia terapêutica das CTMs devido à sua heterogeneidade causada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos. Intrinsecamente, as diferentes origens dos tecidos, idade e estado de saúde podem afetar a propriedade e a função das CTMs. Extrinsecamente, o isolamento, a cultura e as condições de expansão *in vitro* também podem afetar a propriedade e as funções biológicas das CTMs (Martins, 2014; Mushahary *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021).

3.2.2 Secretoma

Como os estudos relacionados sobre as técnicas terapêuticas de CTMs demonstraram ser muito promissoras, Gnechchi *et al.* (2005) descobriram que as CTMs mediavam seus efeitos terapêuticos pela liberação de moléculas tróficas, conhecidas como secretoma. A partir disso, foi visto que quando transplantadas, as CTMs não se tornavam parte do local lesado, e várias evidências indicavam que o secretoma era o principal responsável pelo reparo tecidual mediado pelas CTMs (Teixeira *et al.*, 2013).

O secretoma de CTMs tem sido descrito como uma mistura complexa composta por uma fração solúvel proteica, constituída por fatores de crescimento, citocinas e uma fração vesicular composta por microvesículas e exossomos (Teixeira *et al.*, 2020). Esses compostos estão envolvidos na transferência de proteínas e material genético, como por exemplo, micro RNAs, para outras células, com efeitos terapêuticos promissores (Teixeira *et al.*, 2013). Por isso, o próprio secretoma das CTMs está sendo considerado como componente farmacêutico ativo com grande potencial (Bari *et al.*, 2018).

O uso do secretoma apresenta diversas vantagens em relação ao próprio transplante de células, pois os poucos ensaios clínicos já realizados até o momento revelaram segurança e exequibilidade, sem efeitos adversos relatados, indicando o secretoma como uma fonte de agentes bioativos que podem ser armazenados e transportados com eficiência como um produto biológico pronto para uso. Mesmo diante de tantos benefícios, a utilização e os mecanismos advindos do uso do secretoma de CTMs, precisam ser melhor avaliados e elucidados, isso porque a descoberta das suas vantagens é muito recente na literatura.

Em 2016, Pires *et al.* demonstraram que o secretoma de CTMs de diferentes fontes de tecidos possuem diferentes perfis secretores e composições exossômicas distintas, indicando que tal diferença em seu padrão de secreção pode indicar que seu secretoma ou vesículas derivadas podem ser específicos para uma condição patológica. Isso demonstra a grande necessidade de caracterizar adequadamente o potencial terapêutico do secretoma e de todos os seus

componentes, para assim poder padronizar um protocolo desde a produção de secretoma até ao isolamento de seus componentes de interesse para cada tratamento alvo.

O uso terapêutico do secretoma aumenta a sobrevivência das células no transplante, pois possui compostos com menor expressão de proteínas de superfície celular, proporcionando menos imunogenicidade quando comparados a células vivas e proliferativas (Teixeira *et al.*, 2020). Foi demonstrado também que o uso do secretoma reduz consideravelmente o número de células necessárias para o transplante, bem como possíveis alterações fenotípicas (Vizoso *et al.*, 2017). Além dessas vantagens, o secretoma é mais econômico e prático para aplicações clínicas, pois evita procedimentos invasivos de coleta de células, sempre vão estar imediatamente disponíveis para o tratamento, sendo um produto adquirido pronto para o uso, necessitando apenas diluí-lo em tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline* - PBS).

Com o objetivo de demonstrar a eficácia do secretoma, Sanchez-Castro *et al.*, (2021) realizaram um estudo piloto usando o secretoma de CTMs derivado de tecido adiposo humano, como um agente terapêutico para o veneno da serpente da espécie *Bothrops atrox*, um agente patológico miotóxico que causa mionecrose local e hemorragia. Os resultados deste estudo preliminar mostraram um potencial efeito benéfico do secretoma de CTMs sobre a lesão muscular causada pelo veneno botrópico. Esses resultados sinalizam que o secretoma pode reduzir a extensão da mionecrose aguda, favorecendo uma resposta regenerativa mais bem-sucedida.

3.3 Fisiopatologia da cicatrização de feridas

A pele fornece proteção contra lesões físicas, químicas e microbiológicas e a perda da sua integridade pode resultar em um desequilíbrio fisiológico. Ela é o maior e mais visível órgão do corpo, a qual se constitui como barreira anatômica e fisiológica entre o animal e o ambiente (Scot, 2000). Nesse sentido, a ruptura normal da estrutura corporal denomina-se ferida e estas podem decorrer de fatores intrínsecos e extrínsecos (Pavletic, 2010). A busca pela adequada manipulação da estrutura danificada, incentiva a correta avaliação e classificação da região lesionada, além de intensificar a realização de pesquisas científicas envolvendo o processo de cicatrização (Hosgood, 2006).

A cicatrização se inicia imediatamente após a lesão ou incisão de pele, combinando uma série de fatores físicos, químicos e celulares. Pode ser determinada como um fenômeno biológico, altamente coordenado, complexo, dinâmico, intercedido e sustentado por grupos

celulares, mediadores bioquímicos e hemodinâmicos, para assegurar a restauração morfofuncional do tecido lesionado (Sahota *et al.*, 2004).

A dinâmica de cicatrização é promovida por eventos que são descritos didaticamente em fases fundamentais, que equivalem aos principais achados macro e microscópicos observados em um período de tempo estabelecido. As fases são divididas em: hemostasia, inflamatória, proliferativa, deposição de matriz e de remodelação tecidual (Frank *et al.*, 1996; Hosgood, 2006). Contudo, é um processo dinâmico e pode ocorrer uma sobreposição entre as fases, não sendo possível estabelecer a ocorrência de cada uma em períodos sistematicamente específicos (Hosgood, 2006). Durante o processo ocorrem uma interação que envolvem diferentes tipos celulares, envolvendo queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, neutrófilos, macrófagos e plaquetas (Hosgood, 2003; Barrientos *et al.*, 2008). Salienta-se que a aposição das fases e os diferentes tipos celulares envolvidos, contribuem sumariamente para a evolução do processo (Kumar *et al.*, 2005). Verifica-se uma regulação por diversos fatores quimiotáticos e fatores de crescimento que além da função quimiotaxia, induzem a proliferação e ativação celular (Hosgood, 2006), conforme mostra o quadro 2:

Quadro 2 - Principais grupos celulares e mediadores liberados durante a cicatrização tecidual.

GRUPOS CELULARES	PRINCIPAIS MEDIADORES LIBERADOS	EFEITOS DESENCADEADOS
Plaquetas	TGF- β , PDGF, PAF, fibrinogênio, fibronectina, tromboplastina, EGF	Formação do trombo plaquetário e recrutamento de neutrófilos e monócitos
Neutrófilos	IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β	Recrutamento de monócitos e macrófagos
Linfócitos	IFN- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α	Ativação de macrófagos, recrutamento de leucócitos, fibroblastos.
Monócitos/macrófagos	TGF- β , VEGF-A, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, IGF-1, MMP	Quimiotaxia de monócitos e fibroblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese e remodelamento de colágeno.
Fibroblastos	FGF1, FGF2, FGF4, KGF, FGF10, IL-8, TGF- β , IGF-1	Maturação e remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e colagenização assim como estímulo da migração, proliferação e diferenciação epitelial
Queratinócitos	MCP-1, FGF1, FGF2, TGF- β	Maturação e remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e colagenização

Células endoteliais	MCP-1, CTGF, TIMP, VEGF-A	Maturação e remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e colagenização
Células epiteliais	VEGF-A	Aumento da permeabilidade vascular e estímulo da proliferação de células endoteliais

Fonte: Adaptado de Hosgood, 2006.

3.3.1 Fase de hemostasia

A hemostasia é a primeira fase da cicatrização de feridas acontecem instantaneamente após a injúria tecidual. O sangue e a linfa dos vasos sanguíneo e linfáticos rompidos vão preencher o local lesionado, contudo rapidamente, ocorre uma vasoconstrição transitória que é induzida por compostos vasoativos como catecolaminas e histaminas. A vasoconstrição é desencadeada tanto por influência nervosa, por meio de uma descarga adrenérgica, quanto pela ação de mediadores originados da degranulação de mastócitos e dura aproximadamente 10 minutos visando à minimização de perda de sangue para o espaço extravascular (Balbino *et al.*, 2005; Reinke e Sorg, 2012).

Em seguida ocorre uma vasodilatação que favorece o influxo de fluídos, células sanguíneas e plaquetas para o espaço extravascular, o que conseqüentemente ativa a cascata de coagulação e sintetiza a formação do coágulo sanguíneo. O coágulo atua captando as bordas da ferida, limita a perda de sangue e fluído, o que acarreta a formação imediata de barreira contra agentes exógenos (Barbul, 2006; Hosgood, 2006). Dentro do coágulo é formada uma matriz extracelular provisória (MEP), composta por dímeros de fibronectina que se associam à fibrina, que detém diversos sítios para adesão celular, com neutrófilos, macrófagos e células de tecido conjuntivo. Os leucócitos são recrutados para o sítio de lesão durante a coagulação, através de mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos (Hosgood, 2006; Barrientos *et al.*, 2008).

3.3.2 Fase inflamatória e desbridamento

A fase inflamatória é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células circulatórias, liberação de citocinas e de fatores de crescimento, como também a ativação de células (Hedlund, 2007). Durante esta fase ocorre à migração leucocitária para o leito da ferida, sendo considerada a fase de preparado do leito da ferida para o começo da cicatrização. Os neutrófilos sofrem quimiotaxia, através de mediadores inflamatórios produzidos pela matriz extracelular provisória (MEP), como os fibrinopeptídeos, gerados pela conversão do fibrinogênio em fibrina (Hosgood, 2006). À medida que o tecido necrótico desnaturado é

degradado, ocorrem a liberação de proteinases, que são substâncias liberadas pelos próprios neutrófilos, potencializando a atração dos mesmos. Os neutrófilos são responsáveis pela fagocitose de bactérias e restos extracelulares (Balbino *et al.*, 2005) e também pela liberação de radicais superóxidos que resulta na morte local das bactérias, degradação da matriz extracelular desnaturada assim como células comprometidas, favorecendo a formação de exsudato no leito da ferida (Hosgood, 2003). Os neutrófilos vão atuar também nas reações de formação tecidual mediante a síntese de fatores de crescimento e citocinas, sendo encarregados pela recomposição da celularidade regional e restauração da homeostasia tecidual (Beer *et al.*, 2000). Após o segundo dia, devido à meia vida curta dos neutrófilos, estes vão sendo aos poucos substituídos por monócitos, que se modificam em macrófagos ativos na ferida (Hatanaka e Curi, 2007).

Os macrófagos desempenham um papel muito importante na fase inflamatória, com atividade fagocítica e de desbridamento de corpos estranhos, modulam a produção e destruição da MEP, atuam como células apresentadoras de antígeno, induzem apoptose celular e também participam da liberação de muitas citocinas, que dão início a formação de tecido de granulação além de liberarem fatores de crescimento e mediadores bioquímicos, que iniciam e sustentam o processo cicatricial (Singer e Clark, 1999; Kumar *et al.*, 2005; Peranteau *et al.*, 2008; Guo e Dipietro, 2010, Koh e Dipietro, 2011). A força biomecânica da ferida na fase inflamatória ainda é pequena, sendo a fibrina presente no coágulo sanguíneo a responsável pela sua sustentação (Hosgood, 2003).

3.3.3 Fase Proliferativa

O processo proliferativo é dividido em angiogênese, fibroplasia e epitelização, sendo essa fase a responsável pelo "fechamento" da lesão. Na reepitelização ocorre a migração de queratinócitos das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, os fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio (Lawrence e Diegelmann, 1994; Reinke e Sorg, 2012).

Inicialmente a angiogênese ocorre a partir de capilares sanguíneos íntegros ou recém-danificados que são estimulados por fatores angiogênicos a preencher e migrar para o local da lesão, sendo necessária para suprimento de oxigênio e nutrientes do tecido de granulação formado (Singer e Clark, 1999; Hosgood, 2003). Essa fase é regulada através de fatores de crescimento, como TNF- α , TGF-b, VEGF, FGF, PDGF, macrófagos e células endoteliais danificadas (Raja *et al.*, 2007)

A migração e ativação de fibroblastos na ferida é caracterizada pela fibroplasia em decorrência da liberação de citocinas como INF- γ e TGF- β , principalmente pelos macrófagos (Reinke e Sorg, 2012). Estes grupos celulares são os principais componentes do tecido de granulação e tem como função primordial a produção de colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que formarão o tecido conjuntivo, substituindo a matriz extracelular provisória por um tecido mais forte e elástico (Guo e Dipietro, 2010).

Nesse sentido, o novo tecido começa a invadir o espaço aproximadamente quatro dias após a lesão (Hosgood, 2003). E as atividades iniciais presentes na epitelização são a mobilização e proliferação de queratinócitos, presentes na margem da ferida, e das células-tronco epidérmicas provenientes dos anexos epidérmicos como os folículos pilosos e glândulas sebáceas (Reinke e Sorg, 2012). Segundo estudos recentes os folículos pilosos são o maior reservatório de células progenitoras para uma variedade de populações celulares, que possuem papel importante na cicatrização de feridas (Lau *et al.*, 2009).

Essas células se aderem umas às outras e interagem com uma variedade de proteínas presentes da matriz extracelular, como a fibronectina (Singer e Clark, 1999). O caminho para a migração celular é determinado por integrinas expressas na superfície de outras células epidérmicas e para que ela ocorra de forma adequada é necessário que ocorra dissolução da matriz extracelular provisória por collagenases produzidas pelas próprias células epidérmicas (Hosgood, 2006).

Com a evolução dos processos proliferativos, observa-se redução no tamanho da ferida, processo marcado por intensa fibroplasia. Os fibroblastos assumem um fenótipo de miofibroblastos que se caracterizam por microfilamentos contendo actina (Guo e Dipietro, 2010).

3.3.4 Fase de Maturação e Remodelamento

A fase de maturação e remodelamento caracteriza-se por eventos tais como, deposição, agrupamento, remodelação do colágeno e regressão endotelial. Além disto, ocorre também a diminuição de todos os elementos celulares, inclusive as células inflamatórias (Tazima *et al.*, 2008). É considerada a última fase da cicatrização cutânea e pode ter duração de meses até um ano. A transição do tecido de granulação para a cicatriz requer o remodelamento e maturação do conteúdo de tecido conjuntivo da ferida, pelas enzimas proteolíticas (metaloproteinases da matriz) e, que irão degradar colágeno (Reinke e Sorg, 2012). Essas enzimas são secretadas por macrófagos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, e controlam a velocidade de degradação do colágeno na ferida (Hosgood, 2003).

Em casos de análises terapêuticas, com relação a cicatrização de feridas, é essencial uma investigação minuciosa para avaliar todos os fatores que podem nesse processo. Dos fatores gerais, a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base, como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de drogas sistêmicas podem interferir no processo cicatricial (Halloran e Slavin, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido considerando os princípios éticos, respeitando o bem estar animal a fim de reduzir o desconforto dos animais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, com o protocolo CEUA nº131/2020.

4.1 Seleção dos animais

Foram utilizados 16 coelhos machos, adultos, Nova Zelândia, com peso médio de 2,0 kg, provenientes da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da EV-UFMG, no município de Igarapé (MG). Os animais permaneceram durante o tempo de experimentação separados em gaiolas metálicas individuais de dimensões de aproximadamente 75 cm de comprimento por 30 cm de largura e 30cm de altura, no Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal (LAMACA) da EV/UFMG, recebendo água, ração e feno *ad libitum*.

4.2 Obtenção do veneno e secretoma de células-tronco mesenquimais

Um *pool* de veneno proveniente da espécie *Loxosceles intermedia* foi obtido do Laboratório de Imunologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (UFMG), gentilmente cedido pelo Prof. Carlos Delfin Chávez Olórtegui.

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

4.3 Grupos experimentais

Os animais foram submetidos a um período de adaptação de sete dias e posteriormente distribuídos em grupos de quatro animais (n=4).

À exceção do grupo controle (grupo I), que foi submetido apenas à aplicação de secretoma (60µg de secretoma diluído em tampão fosfato-salina a 0,5%), todos os outros grupos foram desafiados com 10µg de veneno de *Loxosceles intermedia*, diluído em NaCl 0,9%, via intradérmica na região interescapular e, tratados 30 minutos após a injeção do veneno de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos animais nos diferentes grupos e protocolos de tratamento após injeção do veneno de *Loxosceles intermedia*.

GRUPO	DESCRIÇÃO
GI	Administração intradérmica de 60µg de secretoma diluído em PBS 0,5%
GII	Administração intradérmica de 10µg de veneno de <i>L. intermedia</i> diluído em PBS 0,5% e tratamento com NaCl 0,9% via intradérmica
GIII	Administração intradérmica de 10µg de veneno de <i>L. intermedia</i> diluído em PBS 0,5% e tratamento com 60µg de secretoma diluído em PBS 0,5% por via intradérmica
GIV	Administração intradérmica de 10µg de veneno de <i>L. intermedia</i> diluído em PBS 0,5% e tratamento com 60µg de secretoma diluído em PBS 0,5% por via endovenosa (veia auricular marginal lateral)

4.4 Injeção do veneno e tratamento com secretoma

Para administração do veneno de *Loxosceles intermedia* e tratamento com secretoma não foram necessários métodos de contenção química, realizando-se apenas contenção manual.

Para as aplicações foram utilizadas seringas de insulina (100 u.i.), após tricotomia e desinfecção com clorexidina 0,5%.

Todos os animais receberam o secretoma na mesma dose (60µg de secretoma diluído em PBS 0,5%), 30 minutos após o desafio. Os animais dos grupos I, II e III receberam o secretoma em quatro pontos equidistantes, na região interescapular por via intradérmica, e o grupo IV, recebeu o secretoma via endovenosa, na veia auricular maginal lateral da orelha.

A figura 2A mostra a contenção física de um animal do GIV, e figura 2B, a administração endovenosa de secretoma na veia auricular maginal lateral da orelha desse mesmo animal.

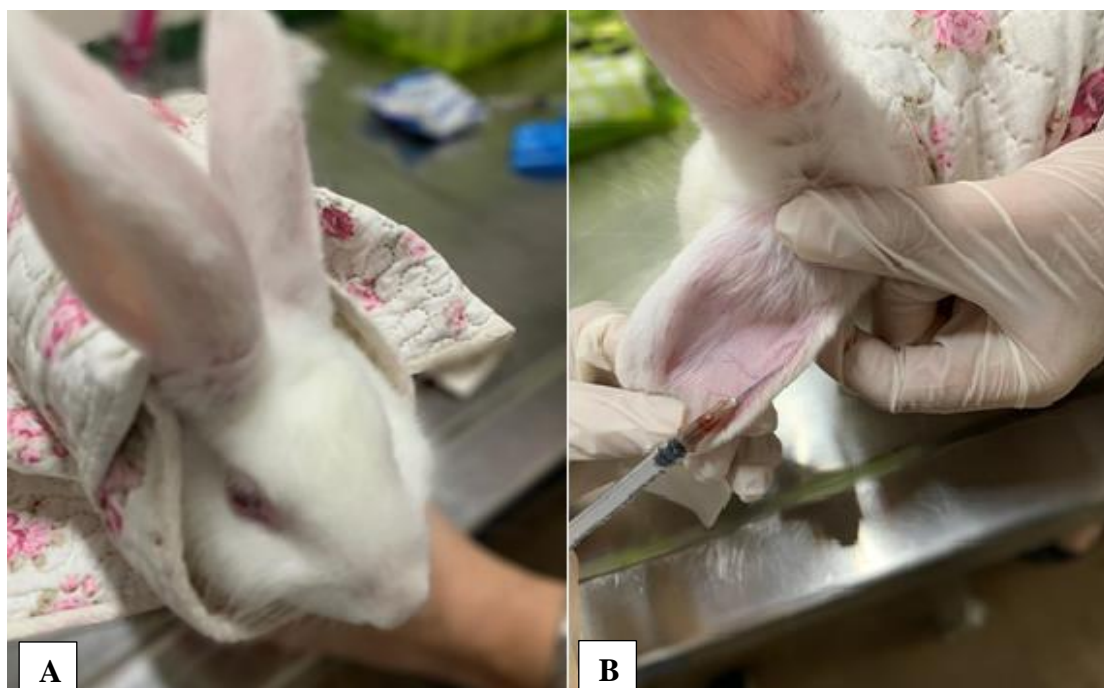


Figura 2: Contenção física do animal (a) e injeção endovenosa de secretoma no coelho do grupo IV (b).

A figura 3A mostra o ponto central, na região interescapular, da aplicação do veneno de *L. intermedia*, e a 3B, os quatro pontos equidistantes da administração do secretoma.



Figura 3: Ponto central de injeção intradérmica do veneno de *L. intermedia* (coelho do grupo IV) (Fig. 3A) e administração do secretoma em quatro pontos equidistantes ao veneno (coelho do grupo III).

4.5 Coletas de sangue e análises laboratoriais

Amostras de sangue para exames laboratoriais foram coletadas de todos os animais antes (tempo zero) e após os desafios e tratamentos, aos três, nove e 15 dias.

O sangue foi coletado da veia auricular com cateter 24 e distribuídos em três tubos:

- (1) Com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% para determinação dos parâmetros hematológicos, realizados em equipamento hematológico veterinário (Poch-100iV Diff®). Foram avaliados o número de eritrócitos, leucócitos, neutrófilos, plaquetas, e determinados o volume globular (VG), a hemoglobina e os índices hematimétricos - concentração de hemoglobina globular média (CHGM), volume globular médio (VGM) e amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW-CV e RDW-SV). Foram realizadas a contagem diferencial do leucograma em microscopia óptica através de esfregaços sanguíneos corados com panótipo;
- (2) Com citrato de sódio a 10% para obtenção de plasma e avaliações do Tempo de protombina (TP), Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogênio no aparelho QUICK TIMER, com os kits TP e TTPa Clot (Bios Diagnóstica);
- (3) Sem anticoagulante para obtenção de soro, para análise bioquímica composta pela dosagem de creatinina, ureia, SDMA, proteína total, albumina e das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e creatina fosfoquinase (CK). As análises bioquímicas foram realizadas com kits laboratoriais (Bioclin) utilizando analisador bioquímico TP Analyser Basic®- ThermoPlate®.

4.6 Avaliação da área das lesões

Para acompanhar a evolução das lesões e do tratamento estabelecido para cada grupo, as lesões foram mensuradas diariamente e avaliadas pelo aspecto dermatológico como: eritema, edema, halo hemorrágico e necrose. Realizou-se registros fotográficos diários com câmera digital, mantida a uma distância constante de 30 cm da lesão.

As lesões foram avaliadas no primeiro, terceiro, nono e 15º dias, utilizando a fórmula $R = d/2$ conforme Schwarzschild (1996).

4.7 Avaliação histopatológica das lesões

Decorrido o período de 15 dias de tratamento e observação, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com propofol (>10mg/kg) e cloreto de potássio (1,0 mL/kg).

Foram coletadas apenas amostras de pele fixadas em formol a 10% foram processadas por técnica rotineira de inclusão em parafina para realização de cortes histológicos de 4 μ m de espessura. O material foi corado pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para a avaliação histomorfométrica através da análise de microscopia óptica de luz convencional.

Foi realizada análise descritiva de todas as lâminas, sem o conhecimento prévio dos grupos de animais. Avaliou-se alterações na estrutura morfológica da epiderme, derme superficial, profunda e camada muscular.

4.8 Análises estatísticas

As variáveis foram expressas por média e desvio-padrão, exceto para as variáveis VGM, TP, eritema, que foram descritas pela mediana e amplitude.

Para cada variável foi ajustado um modelo misto considerando os fatores grupo, tempo e a interação entre eles como efeito fixo, também foi incluso o efeito do animal como aleatório para ajuste das medidas repetidas.

As premissas de normalidade e homocedasticidade foram conferidas por meio do teste de Shapiro-Wilk e análises gráficas de diagnóstico.

Em caso de significância entre os tratamentos, o teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias.

Quando necessária, foi realizada a transformação logarítmica da variável resposta, no entanto, os resultados estão expressos na escala original. Quando a transformação não foi suficiente para normalização ou estabilização dos resíduos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para avaliação dos grupos dentro de cada tempo e o teste de Friedman para avaliação dos tempos dentro de cada grupo.

O teste de Conover foi utilizado para todas as comparações caso constatado diferença significativa entre grupos ou tempos.

Para as variáveis VGM e TP foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos dentro de cada tempo, se necessário o teste post-hoc de conover foi aplicado.

O teste de Skillings-Mack foi utilizado para comparação dos tempos dentro dos grupos e se necessário o teste de Durbin foi realizado para comparação dos tempos dois a dois.

Para eritema foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para grupos dentro de cada tempo e o teste de Skillings-Mack para os tempos dentro de cada grupo.

As análises post-hoc foram realizadas por meio de o teste de conover ou Dunn e Durbin.

O nível de significância estabelecido foi de 5%. Todas as análises foram realizadas por meio do software R 4.0.4 (R Core Team, 2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos animais e dose inoculada de veneno

O animal selecionado para o estudo foi o coelho, considerado o melhor modelo experimental para produção da lesão dermonecrótica, semelhante à que ocorre no homem e nos animais *pet* (Silva *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 2005).

Para uma avaliação estatística adequada, é importante reduzir o número de variáveis que podem interferir nos resultados avaliados, realizando uma uniformização dos animais, tanto em sexo, idade e peso (Sampaio, 2007). Portanto, para minimizar os efeitos do estrógeno e do cortisol na reparação das feridas, foram utilizados, respectivamente, coelhos machos e um período de adaptação de sete dias (Martins *et al.*, 2011). A dose do veneno escolhida de *L. intermedia*, foi baseada em estudos experimentais que utilizaram doses semelhantes capazes de induzir significativa lesão dermonecrótica (Da Silva *et al.*, 2004; Moura, 2005; Lima, 2016).

5.2 Avaliações de dermonecrose

Foi realizada uma avaliação macroscópica diariamente dos animais, para acompanhar sistematicamente a evolução da ferida dermonecrótica e as diferenças entre os grupos tratados. A dose de 10µg de veneno de *L. intermedia*, induziu nos coelhos uma lesão típica encontrada no loxoscelismo cutâneo, iniciando-se com eritema, formação de halo hemorrágico seis horas após a injeção, associado ao edema, eritema e sensibilidade ao toque, que foram variáveis conforme os indivíduos (Figuras 4 e 5). Após 72 horas, observou-se que o halo hemorrágico (Figuras 5A e 6A) que evoluiu para uma área central de necrose acinzentada (Figuras 5B e 6B). Posteriormente, nove dias após a injeção do veneno, nessa área necrótica, formou-se uma crosta (Figuras 5C e 6C), sendo que no último dia de avaliação (15º dia), a crosta já estava um pouco aderida à pele do animal (Figuras 5D e 6D). As fases de evolução da ferida dermonecótica provocada pelo veneno de *L. intermedia*, coincidem com as feridas observadas em humanos e em alguns modelos de animais (Ferrara *et al.*, 2009; Pauli *et al.*, 2009).

Todos os coelhos desse experimento foram avaliados no mesmo dia, com o intervalo de tempo de seis horas, observando-se as lesões macroscópicas após injeção tanto do veneno como dos tratamentos propostos. A partir desse período, as análises foram realizadas após três, nove e 15 dias da injeção do veneno.



Figura 4: Evolução da ferida dermonecrótica de coelho (GII) após injeção do veneno de *Loxosceles intermedia* e tratamento com NaCl 0,9%. A) Ferida com halo hemorrágico evidente seis horas após a injeção de veneno. B) Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose acinzentada, 72 horas após a injeção do veneno. C) Ferida dermonecrótica com uma crosta bem definida, nove dias após a injeção do veneno. D) Ferida dermonecrótica no último dia de avaliação (15 dias após injeção); observa-se pouca adesão da crosta à pele.

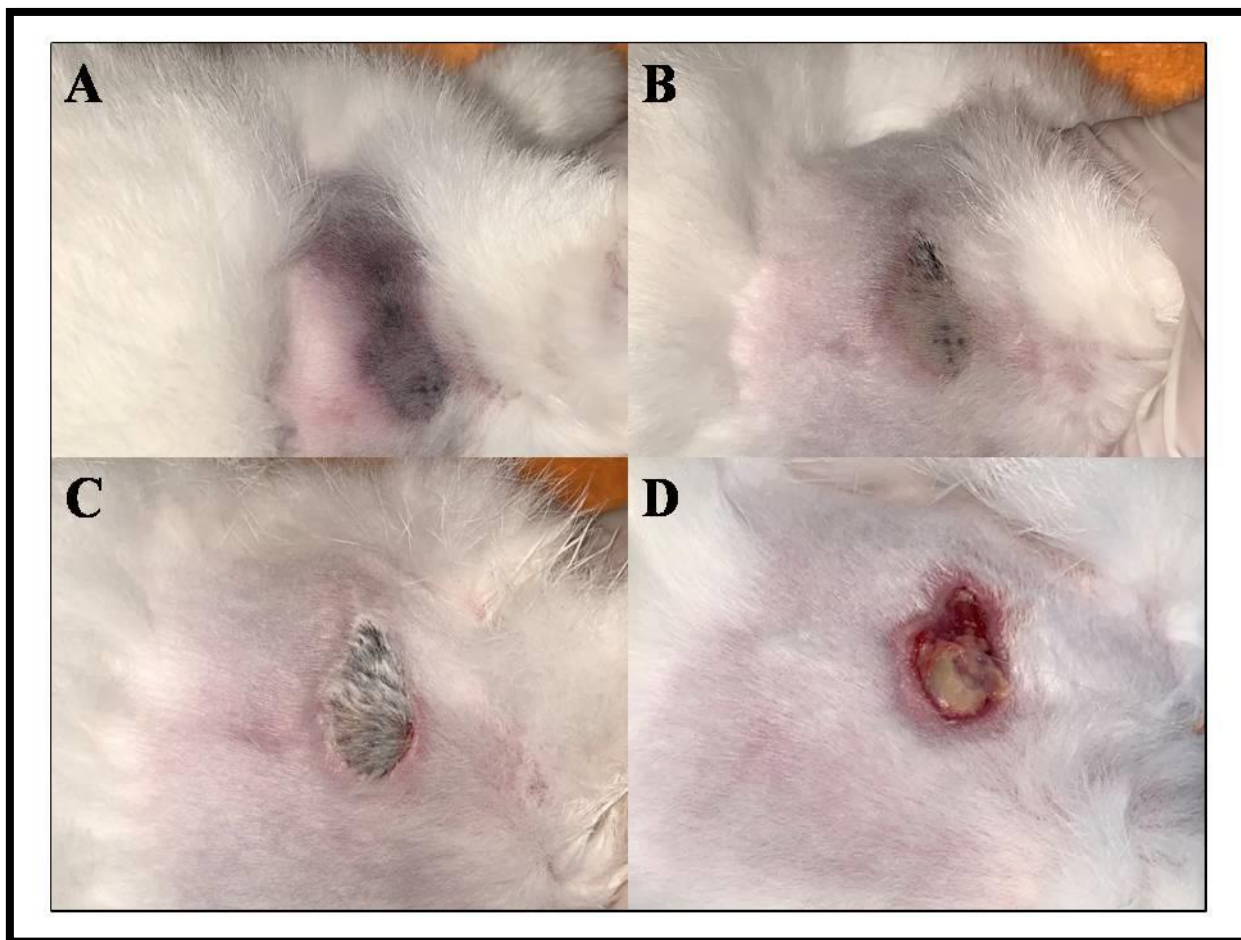


Figura 5: Evolução da ferida dermonecrótica de coelho (GIII) Nova Zelândia após injeção do veneno de *Loxosceles intermedia* e tratamento com secretoma ID. A) Ferida com halo hemorrágico evidente seis horas após a injeção de veneno. B) Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose acinzentada, 72 horas após a injeção do veneno. C) Ferida dermonecrótica com uma crosta bem definida, nove dias após a injeção do veneno. D) Ferida dermonecrótica no último dia de avaliação (15 dias após injeção); observa-se pouca adesão da crosta à pele.

As lesões cutâneas iniciaram-se num tempo médio seis horas, em todos os animais dos grupos que receberam veneno de *L. intermedia*, com ou sem associação dos tratamentos com secretoma. Macroscopicamente, nesse tempo foi possível observar eritema, edema e halo hemorrágico (Tabelas 2 e 3). Na maioria dos animais, a lesão evoluiu com alastramento gravitacional, sendo acompanhada por necrose dérmica a partir de 72 horas após injeção (Tabela 3). Contudo, os resultados demonstraram que apenas a injeção do secretoma, sem associação com o veneno (GI), não foi capaz de causar nos animais, lesões, como eritema, halo ou necrose (Tabelas 2 e 3).

Os animais do grupo I, que receberam somente secretoma (ID) apresentaram discreto edema ($p < 0,05$), com valores próximos à espessura normal da pele dos animais, quando comparados com os animais que foram desafiados com veneno de *L. intermedia* e tratados, sinalizando que o secretoma, de forma isolada, não possui potencial edematogênico. Já nos grupos GII, GIII e GIV, que foram inoculados veneno de *L. intermedia*, com ou sem tratamento, o edema foi significativamente ($p < 0,05$) maior, independente do tratamento realizado. No primeiro dia da injeção do veneno, após tratamentos, os grupos GIII e GIV que receberam o secretoma pelas vias intradérmica e endovenosa, respectivamente, apresentaram maior grau de edema, quando comparado ao grupo tratado com NaCl 0,9% por via intradérmica (GII). Todavia, com o passar do tempo, o edema foi reduzindo nesses grupos (III e IV) e, de forma inversa foi aumentando no grupo I (NaCl 0,9%). Na avaliação final (15º dia), comparativamente, o edema foi menor nos grupos tratados com secretoma, quando comparado ao grupo NaCl 0,9% (GII).

O eritema, avaliado com paquímetro, foi acompanhado apenas nos grupos que receberam veneno de *L. intermedia* (GII, GIII e GIV), já que os animais do GI, não apresentaram qualquer manifestação de vermelhidão na pele. Comparativamente, no primeiro dia, os grupos II e III foram similares entre si, e diferentes do grupo IV que apresentou menor presença de eritema ($p < 0,05$) (Tabela 2). O eritema é o sinal dermatológico mais precoce e frequentemente observado em lesões causadas no envenenamento de *Loxosceles*, como observaram Silva *et al.* (2004) e Tambourgi *et al.*, (2010).

Tabela 2 - Valores das medianas \pm amplitude de eritema de coelhos tratados com secretoma (GI) e desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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

	TEMPO		GRUPOS		
	Dia	GI	GII	GIII	GIV
Eritema	1º (6h)	0,0 \pm 0,0 ^A	1,0 \pm 1,0 ^B	1,0 \pm 1,0 ^B	1,0 \pm 0,25 ^C
	3º	0,0 \pm 0,0 ^A	1,0 \pm 0,25 ^A	0,5 \pm 1,0 ^A	0,5 \pm 1,0 ^A
	9º	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	1,0 \pm 0,25 ^B	0,0 \pm 0,0 ^A
	15º	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	0,5 \pm 0,5 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tratamentos para cada grupo ($P < 0,05$). Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para grupos dentro de cada tempo e o teste de Skillings-Mack para os tempos dentro de cada grupo. GI - Injeção intradérmica de secretoma; GII - Injeção intradérmica de *L. intermedia*; GIII - Injeção intradérmica de *L. intermedia* + secretoma e GIV - Injeção Intradérmica de *L. intermedia* e secretoma endovenosa.

Tabela 3 - Valores médios± desvio padrão de edema, halo hemorrágico e necrose de coelhos tratados com secretoma (GI) e desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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

	TEMPO		GRUPOS			
	Dia	GI	GII	GIII	GIV	
Edema	1º (6h)	0,25±0,05 ^A	1,17±0,35 ^B	1,70±1,53 ^B	1,25±0,05 ^B	
	3º	0,22±0,05 ^A	1,27±0,39 ^B	1,02±0,28 ^B	1,25±0,20 ^B	
	9º	0,20±0,00 ^A	1,02±0,46 ^B	0,85±0,17 ^B	0,90±0,14 ^B	
	15º	0,20±0,00 ^A	0,95±0,38 ^B	0,65±0,05 ^B	0,75±0,31 ^B	
Halo	1º (6h)	0,0±0,0 ^A	1779,6±3523,5 ^B	3540,0±4070,3 ^B	1772,5±3528,3 ^B	
	3º	0,0±0,0 ^A	6679,6±9248,1 ^B	9621,0±19229,3 ^B	4907,6±9811,5 ^B	
	9º	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	197,4±391,6 ^B	
	15	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	
Necrose	1 (6h)	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	
	3º	0,0±0,0 ^A	0,0±0,0 ^A	1,22±2,45 ^A	0,44±0,88 ^A	
	9º	0,0±0,0 ^A	0,17±0,23 ^A	1,95±2,10 ^A	0,50±1,00 ^A	
	15º	0,0±0,0 ^A	0,54±0,72 ^A	197,3±391,7 ^A	0,94±1,33 ^A	

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente entre os tratamentos para cada grupo ($P < 0,05$). Análises realizadas pelo teste de Tukey. GI - Injeção intradérmica de secretoma; GII - Injeção intradérmica de *L. intermedia*; GIII - Injeção intradérmica de *L. intermedia* + secretoma e GIV - Injeção Intradérmica de *L. intermedia* e secretoma endovenosa.

O halo hemorrágico não foi observado no grupo I e, foi presente nos grupos que receberam veneno (GII, GIII e GIV), mas nos tempos 1 e 3, não houve diferença entre eles ($p > 0,05$). Deve ser salientado que, no nono dia, somente nos animais do grupo IV, desafiados com veneno de *L. intermedia* e tratados com secretoma via endovenosa, ainda havia halo hemorrágico. Todavia, macroscopicamente, nos animais desse grupo IV, apenas um animal apresentou evolução para ferida dermonecrótica.

Todos os animais que receberam de veneno *L. intermedia*, apresentaram sinais macroscópicos do loxoscelismo cutâneo (Isbister e Fan, 2011), mas, nem todos os animais apresentaram a ferida dermonecrótica clássica (Figura 6). A necrose na derme também foi vista na microscopia óptica, que será discutida adiante.

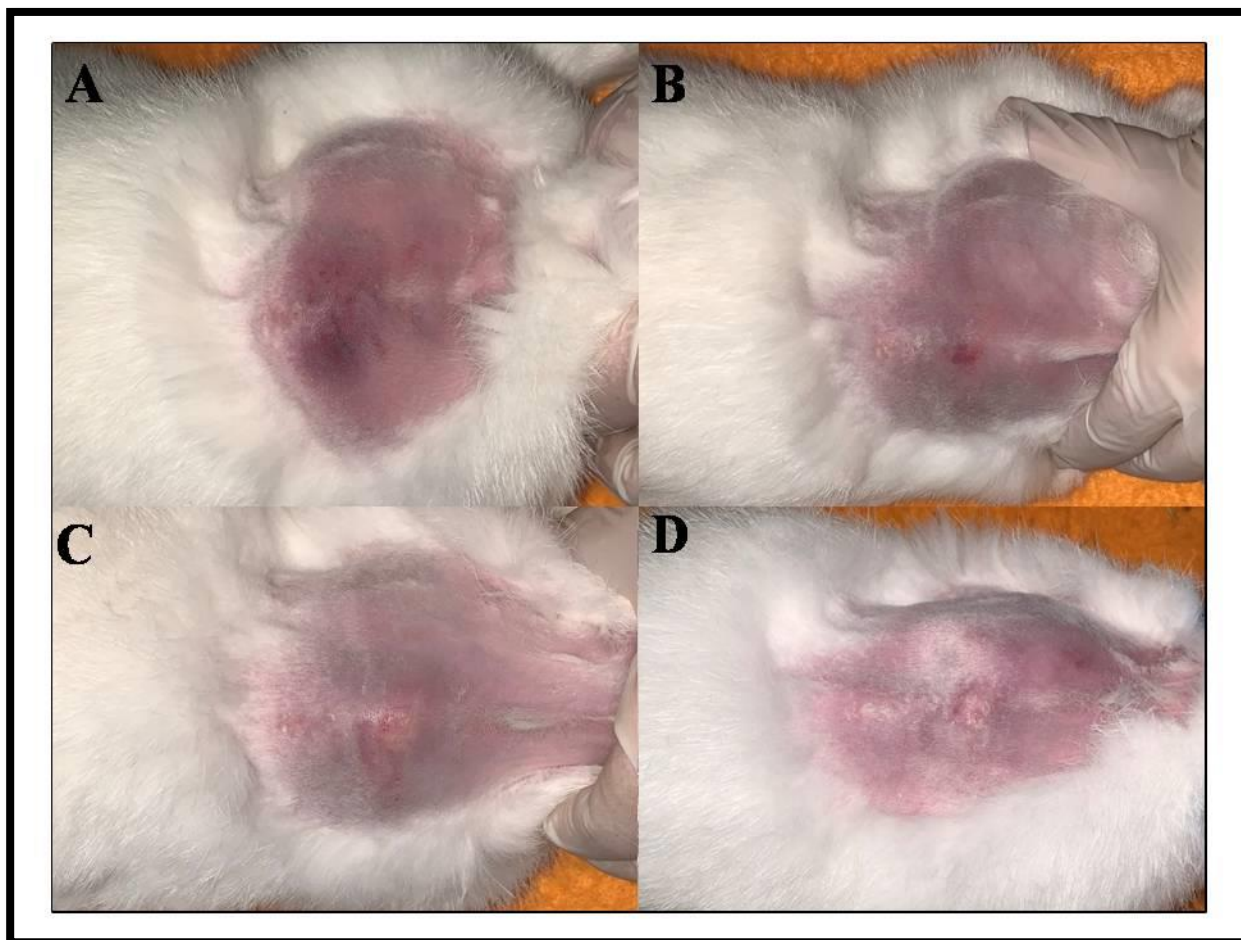


Figura 6: Evolução da ferida dermonecrotica de coelho (G4) após injeção do veneno de *Loxosceles intermedia* e tratamento com secretoma EV. A) Ferida com halo hemorrágico seis horas após a injeção de veneno. B) Ferida apresentando halo hemorrágico difuso, eritema central e intenso edema, 72 horas após a injeção do veneno. C) Ferida hemorrágico difuso e edema, nove dias após a injeção do veneno. D) Ferida no último dia de avaliação (15º dia) com edema e área esbranquiçada central.

Esses resultados corroboram com os achados macroscópicos após a injeção experimental de veneno de *L. intermedia* em coelhos, descritos por Pauli *et al.*, (2009). Além disso, as lesões cutâneas encontradas em coelhos se assemelham muito às lesões descritas no loxoscelismo cutâneo em humanos (Isbister e Fan, 2011). Isso demonstra a eficácia do veneno e dose utilizados para reproduzir lesões cutâneas características do envenenamento e, valida o modelo animal escolhido para testar tratamentos alternativos frente ao loxoscelismo cutâneo. Os estudos com terapias alternativas para o loxoscelismo são de extrema importância, pois as lesões cutâneas quando tardam a cicatrizar tornam-se crônicas, e o tratamento passa a ser um desafio, e muitas vezes, os métodos são reconstrutivos (Bydlowski *et al.*, 2009; Nambu *et al.*, 2009). Por isso, tratamentos inovadores para melhorar a cicatrização e a regeneração cutânea são

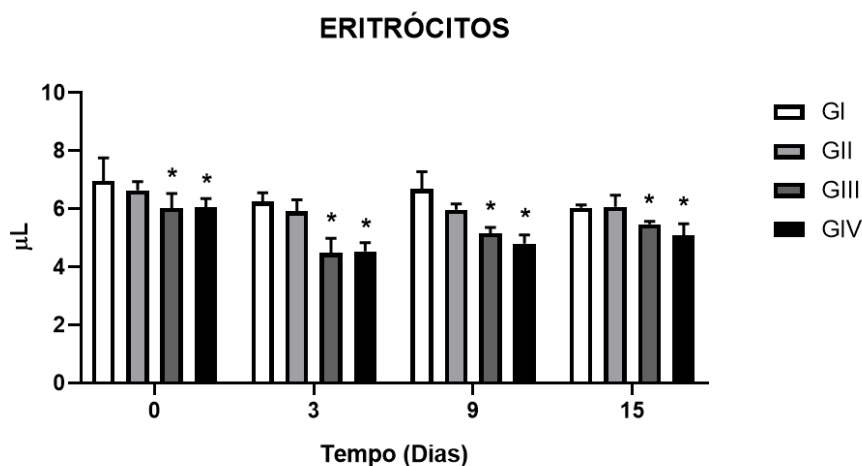
necessários. Embora o tratamento com o secretoma via intradérmica não tenha demonstrado diferença significativa quando comparados com o grupo tratado com NaCl a 0,9% (controle), o grupo que recebeu secretoma por via endovenosa apresentou um resultado satisfatório em relação ao desenvolvimento do edema. Robert *et al.* (2019) descreveram que o secretoma possui proteínas relacionadas à cicatrização e estimula a angiogênese no local da ferida. Salienta-se que, essas propriedades podem ser sensíveis a diferentes fatos: (1) via de administração do secretoma (injeção subcutânea, endovenosa ou aplicação tópica); (2) etiologia de formação da lesão; (3) meio basal usado para coletar o secretoma e; (4) concentração utilizada (Sun *et al.*, 2019).

Os resultados acima sinalizam necessidade de reavaliação utilizando outras doses e períodos de tratamento.

5.3 Avaliações hematológicas

Foram observadas diminuições no número de eritrócitos, hemoglobina e volume globular ($p < 0,05$) nos animais dos grupos GIII e GIV (Figuras 7, 8 e 9) já no tempo zero, ou seja, antes dos desafios e dos tratamentos propostos, sinalizando ausência denexo com os mesmos. Também é importante salientar que esses se mantiveram dentro dos limites de referência para a espécie leporina, sem significado clínico (Carpenter *et al.*, 2012).

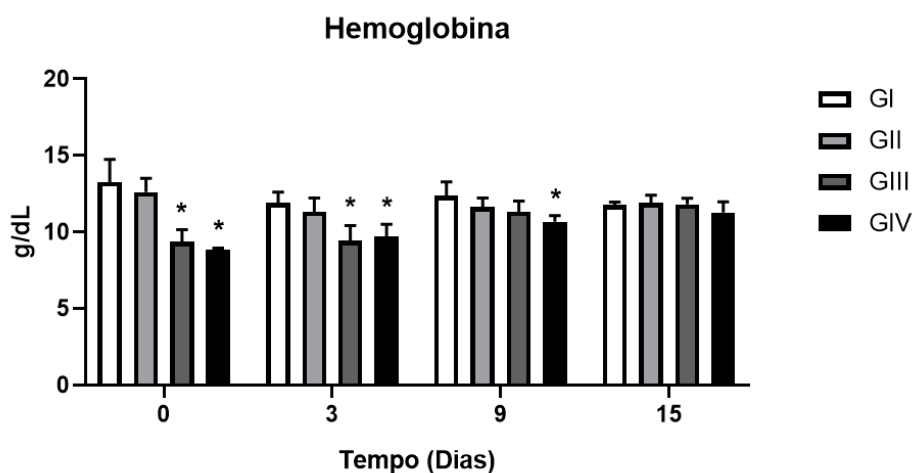
Também, é importante relatar que, os coelhos possuem eritrócitos resistentes à hemólise induzidas pelo veneno de *Loxosceles* spp., pelo fato de apresentarem ausência de glicoforina na superfície dos eritrócitos (Da Silva *et al.* (2003). Em outras pesquisas com coelhos que receberam veneno *L. intermedia*, também não foi relatada reação hemolítica (Futrell; 1992; Pauli *et al.*, 2009, Tavares *et al.*, 2014).



* $P < 0,05$: Teste de Tukey.

Valores de referência segundo Carpenter *et al.*, (2012): 4-8/ μL de sangue

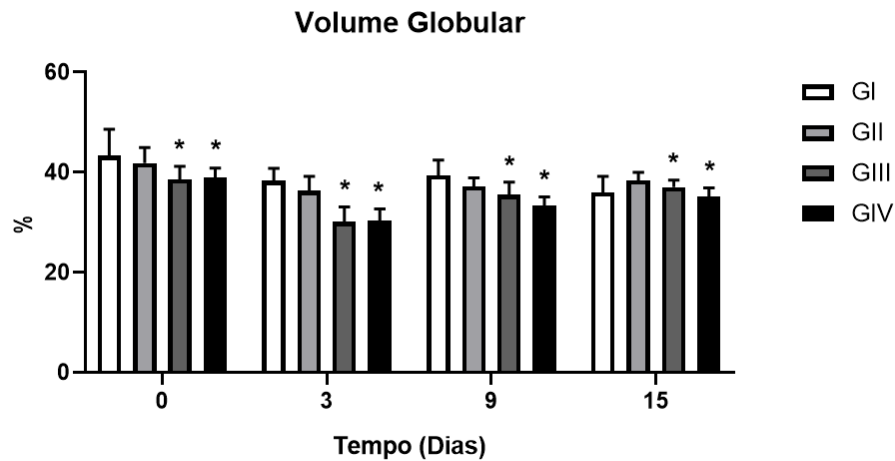
Figura 7: Valores médios \pm desvio padrão do número de eritrócitos $\times 10^6/\mu\text{L}$ de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15º dia após desafio e tratamentos.



* $P < 0,05$: Teste de Tukey.

Valores de referência segundo Carpenter *et al.*, (2012): 8-17,5g/dL

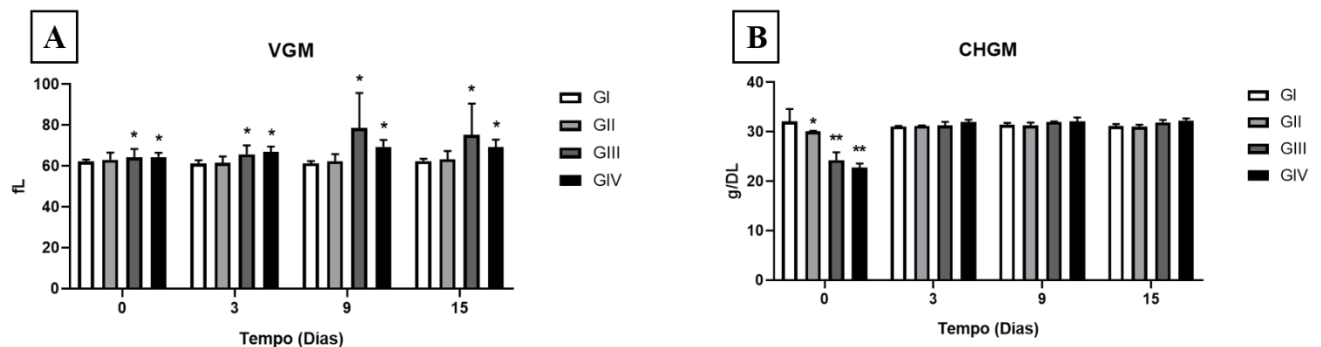
Figura 8 - Valores médios \pm desvio padrão de hemoglobina (g/dL) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15º dia após desafio e tratamentos.



* $P < 0,05$: Teste de Tukey.

Valores de referência segundo Carpenter *et al.*, (2012): 30-50%

Figura 9 - Valores médios \pm desvio padrão de volume globular (%) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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.



* $P < 0,05$: para a variável VGM (A) foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos dentro de cada tempo. Para a variável CHGM (B), a análise foi realizada pelo teste de Tukey.

Valores de referência segundo Carpenter *et al.*, (2012): 58-75fL para VGM e 29-37 g/dL para CHGM.

Figura 10 - Valores médios \pm desvio padrão de VGM (fL) (A) e CHGM (g/dL) (B) 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.

O volume corpuscular médio ou volume globular médio (VGM), é um índice presente no hemograma que indica a média do tamanho das hemácias, e nos coelhos, o valor normal do VCM varia entre 58 e 75 fL segundo Carpenter *et al.*, (2012). Como esse índice é calculado a partir do volume globular (VG) e número de eritrócitos, obviamente, as alterações vão ocorrer nos mesmos

grupos (GIII e GIV) conforme demonstrado na figura 10, com as mesmas diferenças ($p < 0,05$). Contudo, esses valores permaneceram dentro dos valores fisiológicos sem significado clínico.

Em relação a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi observada diferença ($p < 0,05$) apenas no tempo zero (Figura 10B), sem significado clínico, visto que os valores permaneceram dentro dos valores 29-37 g/dL, que são valores de referência para a espécie leporina de acordo com Carpenter *et al.*, (2012), sinalizando ausência de alterações dignas de nota no eritrograma. Sabe-se que o veneno loxoscélico pode causar hemólise intravascular, por ação direta na membrana celular dos eritrócitos e por mecanismos ainda desconhecidos.

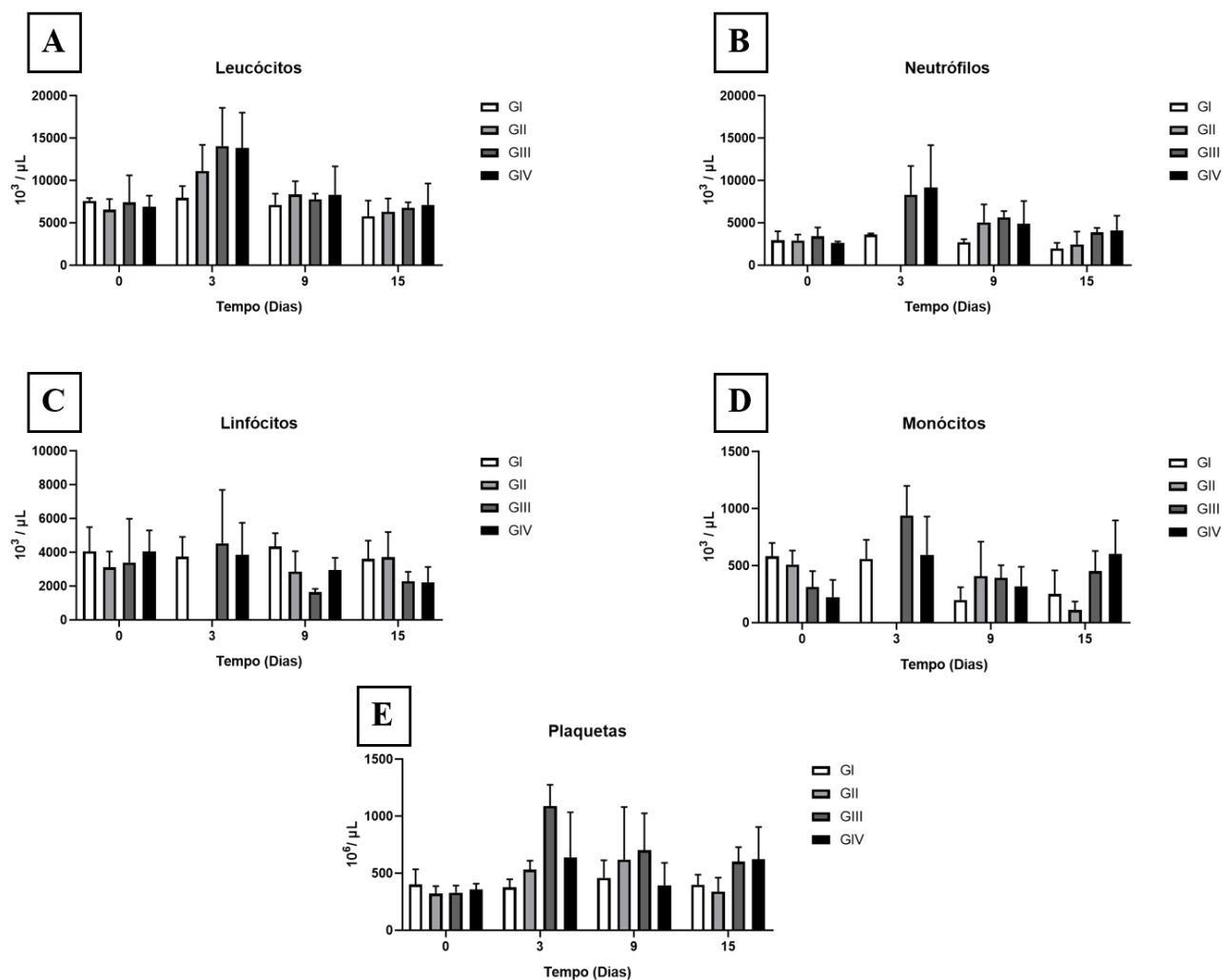
Nesse estudo, o leucograma não apresentou alterações significativas ($p < 0,05$) em todos os grupos e tempos estudados. A figura 11A mostra no terceiro dia, uma tendência de aumento do número dos leucócitos totais nos animais que receberam veneno de *L. intermedia*, mas possivelmente por respostas individuais, houve um maior desvio-padrão interferindo nessa análise. Salienta-se que o número absoluto de leucócitos totais e linfócitos (Figura 11C), permaneceu dentro dos valores fisiológicos para a espécie durante todo o período experimental conforme Carpenter *et al.* (2012). Os leucócitos na circulação sanguínea e tecidual no acidente loxoscélico variam com a dose do veneno aplicada e, conseqüentemente, com a interação a ativação de mecanismos endógenos, tais como ativação do sistema complemento, migração de polimorfonucleares, liberação de enzimas proteolíticas e liberação de citocinas (Silva *et al.*, 2003; Mcglasson *et al.*, 2007; Malaque *et al.*, 2011).

O tempo de avaliação também é importante, pois Silva *et al.* (2003) observaram leucopenia intensa em coelhos, após 24 horas a injeção do veneno de *L. intermedia*, sendo que, cinco dias após o envenenamento ocorreu a normalização do número de leucócitos. Observa-se que a leucopenia está associada à neutropenia no mesmo período, fato esse que ocorre pela migração massiva de neutrófilos para o tecido, horas após o acidente, causando um decréscimo transitório de leucócitos na circulação sanguínea (Tavares *et al.*, 2004). Todavia, nos estudos realizados por Tavares *et al.* (2004), Mcglasson *et al.* (2007) e Martins (2014), foi relatada leucocitose significativa 72 horas após injeção de veneno de *L. gaúcho*, *L. reclusa* e *L. laeta*, respectivamente. Os animais dos grupos GIII e GIV que receberam secretoma por via intradérmica e endovenosa respectivamente, (72 horas após injeção de veneno de *L. intermedia*), apresentaram leucocitose, que foi restaurada a partir do tempo 9, para valores fisiológicos para a espécie leporina, permanecendo até o tempo 15.

Martins (2014) também relatou que no grupo de coelhos inoculado com veneno de *L. laeta* e tratados com dapsona e células-tronco mesenquimais (CTMs), o número de leucócitos totais, assim como de neutrófilos e linfócitos permaneceram dentro dos valores fisiológicos para a espécie leporina durante todo o período experimental. Esse autor acredita que a ausência de leucocitose nesse grupo sugere uma ação benéfica do tratamento de CTMs quando associada à dapsona na evolução da ferida dermonecrótica, visto que ela é extremamente dependente da infiltração neutrofílica.

Para avaliar possíveis danos sistêmicos causado pelo veneno de *L. intermedia*, Polli (2020) realizou análises do hemograma em coelhos. Em seus resultados também não foram detectadas diferenças nas contagens de eosinófilos, monócitos e basófilos entre os tratamentos assim como observado neste estudo.

Ressalta-se que, os monócitos são fagócitos mononucleares que podem se diferenciar em macrófagos e apresentar antígenos para conduzir uma resposta imune. Eles têm um papel fundamental como células apresentadoras de antígenos e, em resposta a vários estímulos, passam da corrente sanguínea para locais periféricos, onde se diferenciam em macrófagos e células dendríticas, contribuindo para a remodelação e reparo do tecido (Rojas *et al.*, 2017). Considerando a importância dos monócitos na resposta inflamatória, e principalmente na cicatrização da lesão cutânea que veneno de *L. intermedia* pode causar, a avaliação tornou-se essencial. Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos, mas houve diferença ($P < 0,05$) 15 dias após a injeção do veneno nos grupos II e IV. No grupo II, observa-se uma diminuição do número de monócitos ($111 \pm 76 / \mu\text{L}$) e, de forma contrária, no grupo IV, um aumento ($603 \pm 294 / \mu\text{L}$).



Valores de referência

Leucócitos X $10^3/\mu\text{L}$: 5,0-12,0; Neutrófilos X $10^3/\mu\text{L}$: 1,49-3,21; Linfócitos X $10^3/\mu\text{L}$: 3,36-7,00, segundo Carpenter *et al.*, (2007 e 2012):

Plaquetas X $10^3/\mu\text{L}$: 290-650; Monócitos X $10^3/\mu\text{L}$: 198,5-403,0 segundo Feldman *et al.*, (2000).

Figura 11 - Valores médios \pm desvio padrão do número absoluto de leucócitos (A), neutrófilos (B), linfócitos (C), monócitos (D) e plaquetas (E) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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.

A figura 11E mostra que não houve variação significativa no número de plaquetas entre grupos em seus respectivos tempos. Todavia, os animais dos grupos GIII e GIV no terceiro e 15º dias, apresentaram aumento do número de plaquetas. Esse resultado é interessante, já que trombocitopenia foi descrita em cães após injeção intradérmica do veneno de *L. reclusa* (Denny *et al.*, 1964). Pauli *et al.* (2009) também observaram trombocitopenia discreta 24 horas após envenenamento loxoscélico e reestabelecimento da normalidade cerca de 72 horas.

Estudos realizados por Tavares *et al.* (2011) evidenciaram que as plaquetas de coelhos requeriam uma concentração duas vezes maior de veneno para atingir uma extensão semelhante de agregação plaquetária que ocorrem em humanos.

O veneno loxoscélico é capaz de promover agregação plaquetária e trombocitopenia horas após o envenenamento, devido ao consumo acenturado de plaquetas no local da ferida, assim como uma provável ação direta e transitória do veneno na medula óssea (Silva *et al.*, 2003; Tavares *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2009). A coagulação intravascular pode ocorrer nessa síndrome em humanos acometidos pelo loxoscelismo, sendo a avaliação plaquetária um parâmetro relevante para avaliação da hemostasia dos animais (Elston *et al.*, 2005).

5.4 Coagulograma

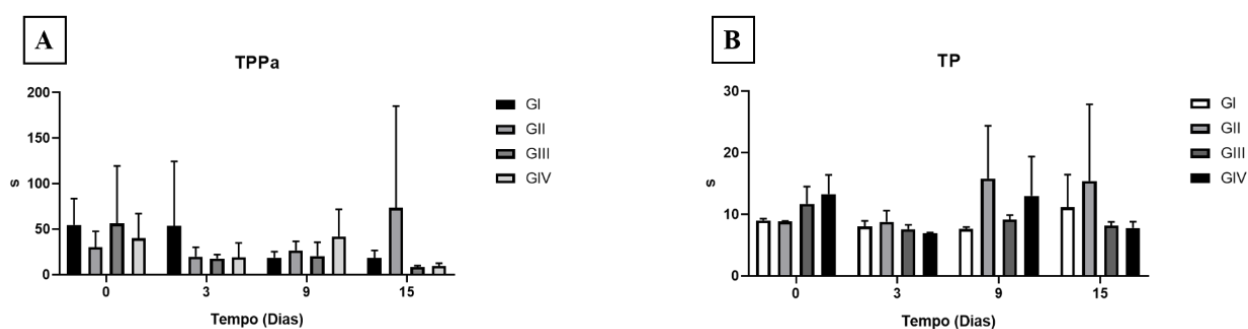
Os exames de triagem da hemostasia como o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP) são exames que avaliam tradicionalmente a via intrínseca, e extrínseca, respectivamente, e ambos avaliam a via comum no modelo de cascata da coagulação (Kaneko, 2008). Contudo, estes testes, não demonstram a complexidade dos fenômenos hemostáticos *in vivo*. Mas ressalta-se que não há um teste que avalie totalmente todas as fases envolvidas na hemostasia, devido a grande complexidade e envolvimento de muitas proteínas, células, íons, plaquetas entre outras moléculas envolvidas no sistema. O TP e TTPa também não demonstram com fidedignidade as fases de amplificação e propagação da hemostasia, onde ocorre maior geração de trombina durante a coagulação (Mann *et al.*, 2003; Wolberg, 2007). Ainda que os testes de TP e TTPa não demonstrem o que ocorre totalmente *in vivo* na hemostasia, esses devem continuar sendo realizados como testes de triagem da hemostasia, sobretudo para os distúrbios de hipocoagulabilidade.

Conforme demonstrado na figura 12A e B não houve alteração significativa ($p > 0,05$) dos valores de TTPa e TP entre grupos e tempos. Todavia, observa-se que o maior valor médio de TTPa ocorreu no GII no 15º dia, além do maior desvio-padrão, ficando acima do valor de normalidade (15,7-42,7 segundos) segundo Feldmann *et al.* (2000). O prolongamento do tempo de coagulação é relatado como distúrbio da hemostasia decorrente da ação do veneno de *Loxosceles* (Bascur *et al.*, 1982). Tavares (2004) e Martins (2014) trabalhando com envenenamento loxoscélico também não observaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, inferindo-se que não houve ativação generalizada da cascata de coagulação, embora, não sendo descartado que, alguns fatores de coagulação envolvidos possam ter sido esgotados durante o período inicial do envenenamento.

Feitosa *et al.* (1998) relataram a presença de metaloproteases no veneno de *L. intermedia*, capazes de degradar fibrinonectina e fibrinogênio (Loxolisina A) e gelatina (Loxolisina B) e postularam a ação da metaloprotease com atividade fibrinogenolítica no processo de coagulação intravascular disseminada (causado pelo veneno loxoscélico), por meio da clivagem parcial do fibrinogênio e consequente formação de fibrina.

Veiga *et al.* (2000) detectaram duas serinoproteases no veneno *L. intermedia* capazes de hidrolisar a gelatina, colocando como premissa que essas serinoproteases poderiam complementar a ação de outras proteases presentes no veneno.

Em relação ao TP, da mesma forma, o grupo que apresentou maior valor médio foi o GII (veneno + NaCl 0,9%) conforme demonstrado pela figura 12B no nono e 15º dia, sinalizando consumo prolongado de fatores da cascata de coagulação.



TPPa foi analisada pelo teste de Tukey e TP pelo teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos dentro de cada tempo.

Valores de referência segundo Feldmann *et al.* (2000): TPPa -15,7-42,7 segundos; TP - 4,07-9,67 segundos.

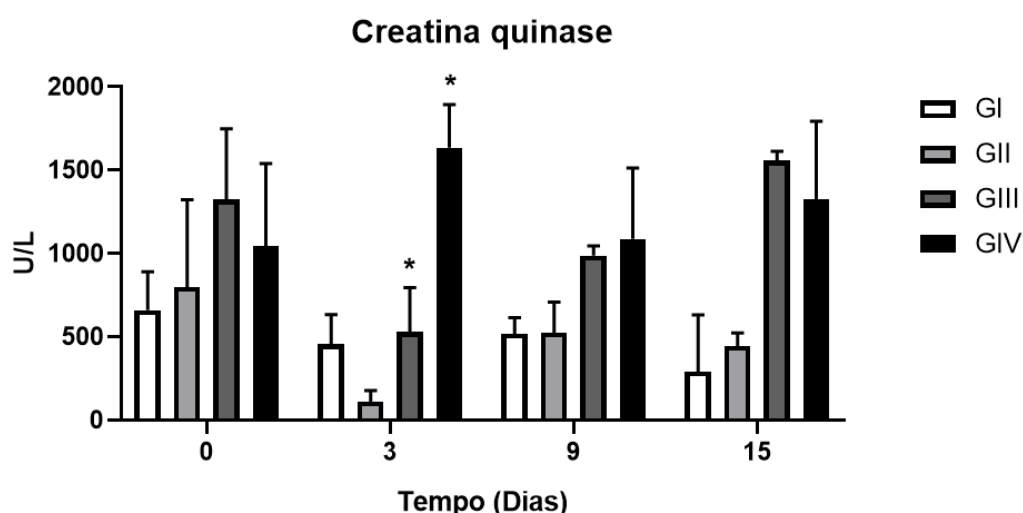
Figura 12 - Valores médios \pm desvio padrão de TPPa e TP (segundo) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por via intradérmica (GII) e endovenosa (GIV), nos tempos zero (antes de qualquer desafio ou tratamento) e no terceiro, nono e 15º dia após desafio e tratamentos.

5.5 Bioquímica sérica

A creatina quinase (CK) é uma enzima que apresenta grande variação e, o manejo dos animais (decúbito prolongado para coleta de sangue e a aplicação de injeções parenterais) é suficiente para seu aumento, conforme visto em todos os animais no tempo zero (Figura 13). Somente no terceiro dia após injeção do veneno e nos grupos tratados com secretoma (GIII e GIV) é que se observou um aumento significativo ($p < 0,05$), evidenciando que esse tratamento contribuiu com a liberação dessa enzima da musculatura esquelética. De forma contrária, Sanchez-Castro *et al.*, (2021) verificaram diminuição da atividade da CK após injeção da

serpente *Bothrops atrox* em animais tratados com secretoma, sinalizando que esse tratamento favoreceu uma resposta regenerativa bem-sucedida com redução da mionecrose no envenenamento botrópico.

No estudo realizado por Martins (2014), também foi verificado um aumento significativo de CK no terceiro dia após injeção de veneno de *L. laeta* em coelhos, e uma redução significativa no sexto e 12º dia após o envenenamento. O aumento dessa enzima visto no terceiro dia após a injeção do veneno sinaliza ação constante do veneno (dano muscular contínuo), já que essa enzima possui curta meia-vida plasmática (aproximadamente, 2 horas) com pico de atividade entre 6 a 12 horas após a lesão muscular (Thrall *et al.*, 2012). O aumento na atividade de CK visto nos resultados deste trabalho, sinalizam que essa deve acompanhada na monitorização desse envenenamento (Kaneko *et al.*, 2008; Thrall *et al.*, 2012).



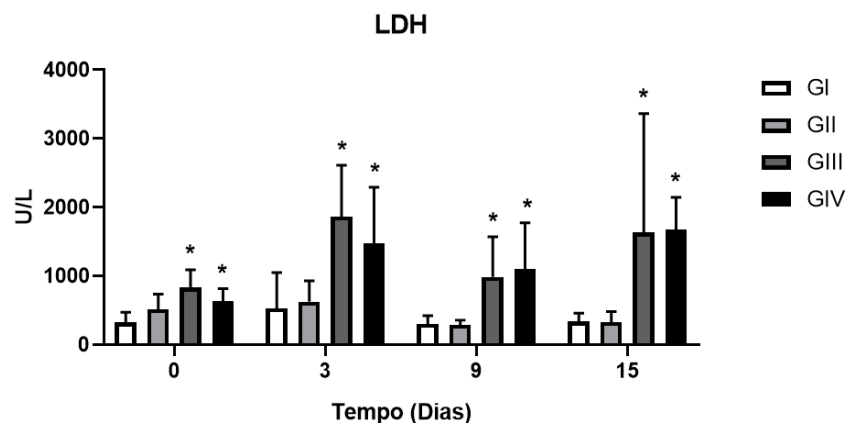
* $P < 0,05$: Teste de Tukey.

Valores de referência de CK, segundo Kaneko *et al.*, (2008): < 544 U/L

Figura 13 - Valores médios \pm desvio padrão da concentração creatinaquinase sérica (U/L) 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.

Apesar de a dosagem de lactato desidrogenase (LDH) ser considerada como um parâmetro pouco específico, visto que é uma enzima intracelular e sua liberação na circulação pode ser influenciada desde um ligeiro dano celular e perda de citoplasma, até necrose celular severa, o que gera diversos graus de elevação da atividade enzimática (Atalan *et al.*, 2019), a LDH pode fazer parte do painel de marcador de danos hepáticos e musculares.

Em relação aos valores de LDH, houve um aumento significativo da sua concentração ($P < 0,05$) nos grupos GIII e GIV (veneno + secretoma ID e EV, respectivamente), em relação aos animais do GII (veneno + NaCl 0,9%) ou apenas o secretoma (GI). Salienta-se que a LDH se comportou de forma semelhante à CK, inclusive no tempo zero, ficando acima dos parâmetros de referência para a espécie leporina (Carpenter *et al.*, 2012), possivelmente, pelos mesmos motivos relatados anteriormente (Figura 14).



* $P < 0,05$: Teste de Tukey.

Valores de referência segundo Carpenter *et al.*, (2012): 34-129(U/L).

Figura 14 - Valores médios \pm desvio padrão de LDH (U/L) 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.

Trocino *et al.*, (2018), relataram que o estresse agudo pode elevar os níveis de LDH em coelhos. Isso ocorre porque o metabolismo anaeróbico começa a produzir lactato causando um aumento no nível de glicose no sangue. Nessa situação, o fígado produz glicose mais que o normal e os valores de LDH aumentam (Atalan *et al.*, 2019).

Para a injeção do veneno e do secretoma, não foram utilizados métodos de contenção química, sendo realizada apenas a contenção física. Porém, foi notável o estresse dos animais durante o processo de contenção para a injeção das substâncias, podendo ter acarretado aumento dos níveis do LDH.

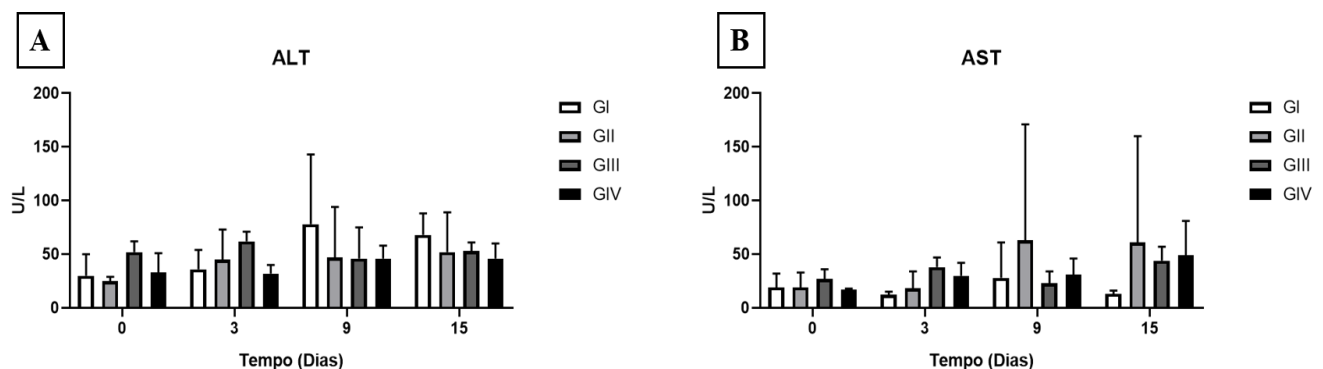
No presente estudo, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos valores das atividades das enzimas AST e ALT (Figura 15), que significa ausência de indução das mesmas, já que todos os animais apresentaram valores dentro dos limites de normalidade para a espécie leporina. O aumento dessas enzimas ocorre em apenas 9% dos pacientes humanos com

loxoscelismo, e geralmente está relacionada a hemólise massiva (Malaque *et al.*, 2011). A ausência de alteração nos valores de AST nesse experimento pode ser explicada pela ausência de alterações hemolíticas, como relatado anteriormente.

Pauli *et al.*, (2009) e Martins (2014), também não observaram aumento de AST e ALT após a injeção *L. intermedia* e *L. laeta* em coelhos. Entretanto, Tavares *et al.* (2004), encontraram aumento no nível de transaminases 24 horas após o envenenamento por veneno de *L. gaucho*, sinalizando uma possível diferença na composição desse veneno.

Clinicamente, níveis plasmáticos de AST e ALT são considerados indicadores importantes de lesões hepáticas celulares, pois essas enzimas são bastante ativas no fígado (Kaneko *et al.*, 2008). Essas enzimas podem ser facilmente detectadas em quantidades muito pequenas e a liberação dessas pode ser causada tanto pela lise celular quanto pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática (De Oliveira *et al.*, 2008; Polli, 2020).

Existem relatos dos efeitos farmacológicos do secretoma incluindo propriedades antiinflamatórias, imunomoduladoras, regenerativas, pró-angiogênicas e antifibróticas. Bari *et al.*, (2020) demonstraram que o secretoma pode ser um bom regulador do aumento dos níveis plasmáticos de AST e ALT em pacientes em estado crítico que foram acometidos pelo novo coronavírus SARS-CoV-2, responsável pela infecção por COVID-19. Isso mostra, que o secretoma pode regular as enzimas AST e ALT de diferentes maneiras, fornecendo benefícios para diversas doenças que podem alterar sua concentração.



Os dados foram analisados pelo teste de Tukey.

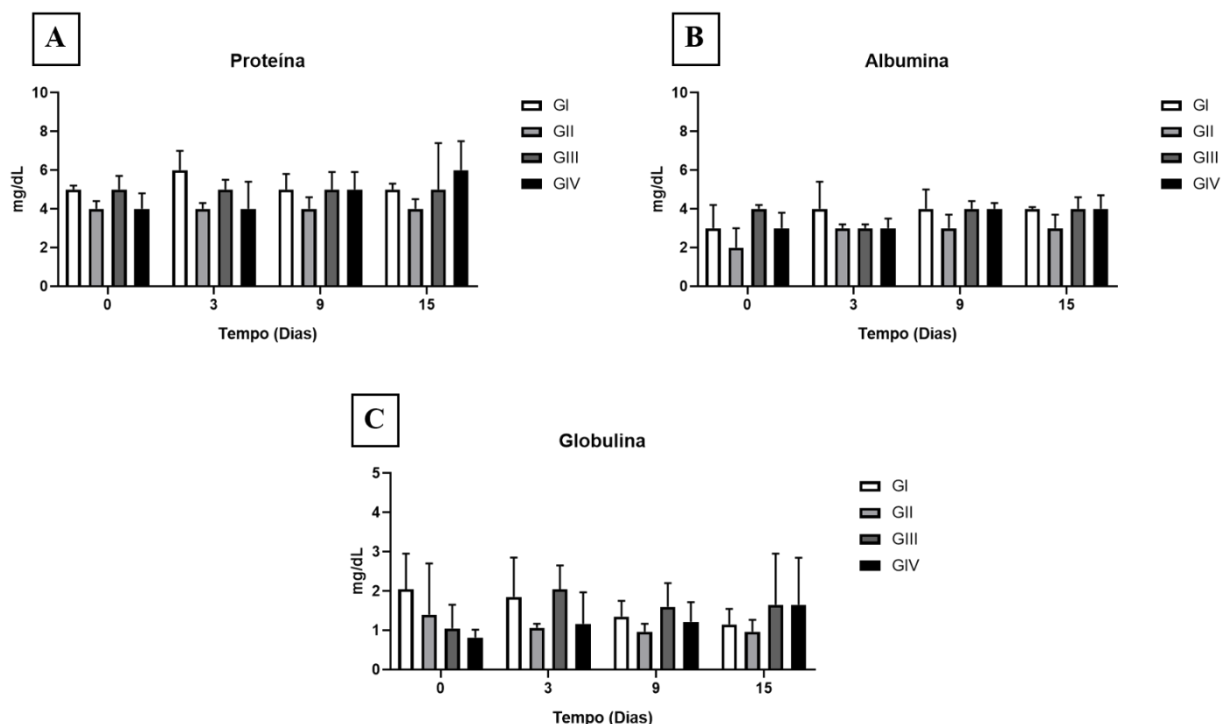
Valores de referência: ALT - 14-80U/L e, AST - 14-113 U/L segundo Carpenter (2012).

Figura 15 - Valores médios \pm desvio padrão da concentração de alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) (U/L) de coelhos tratados com secretoma (GI) e, desafiados com veneno de *Loxosceles intermedia* e tratados com NaCl 0,9% (GII), com secretoma por 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.

Em relação ao proteinograma, os valores de proteína total, albumina e globulinas permaneceram dentro dos padrões fisiológicos para a espécie leporina (Figura 16), exceto no tempo zero, o grupo desafiado com veneno e tratado com NaCl 0,9% (GII) que apresentou discretíssima hipoproteinemia (4,2 mg/dL). Contudo, esse achado não demonstra importância clínica. Os demais valores observados estão de acordo com Ozkan *et al.* (2012), que relataram que o intervalo de proteína total em coelhos adultos varia entre 4,5 a 12,2 mg/dL e, Martins (2014), que demonstrou uma variação de 4,5 a 5,33 mg/dL em coelhos hípidos. No estudo realizado por Tavares *et al.* (2004), após injeção de *L. gaucho* em coelhos, também não houve diferença na proteína total entre grupos, entretanto foi relatada hipoalbuminemia, 72 horas após injeção de veneno.

As proteínas exercem funções vitais no organismo, pois participam da manutenção da pressão osmótica e viscosidade sanguínea, fazem a regulação do pH sanguíneo, transportam substâncias e participam da cascata da coagulação sanguínea (González e Scheffer, 2003). A liberação de diversas citocinas na corrente sanguínea ocorre durante o processo inflamatório agudo, como a IL 1, IL6, IL8, além de TNF α , sendo o fígado responsável por produzir diversas substâncias reagentes na fase aguda. Pode ocorrer também a redução na produção de outras proteínas, como a albumina, nomeada de reagente negativo de fase aguda. A redução dessa proteína pode ocorrer durante os processos envolvendo alterações metabólicas e fisiológicas, baixa síntese pelo fígado, subnutrição, má absorção, caquexia, processo inflamatório agudo, perdas renais, intestinais e cutâneas (Ritchie *et al.*, 1999).



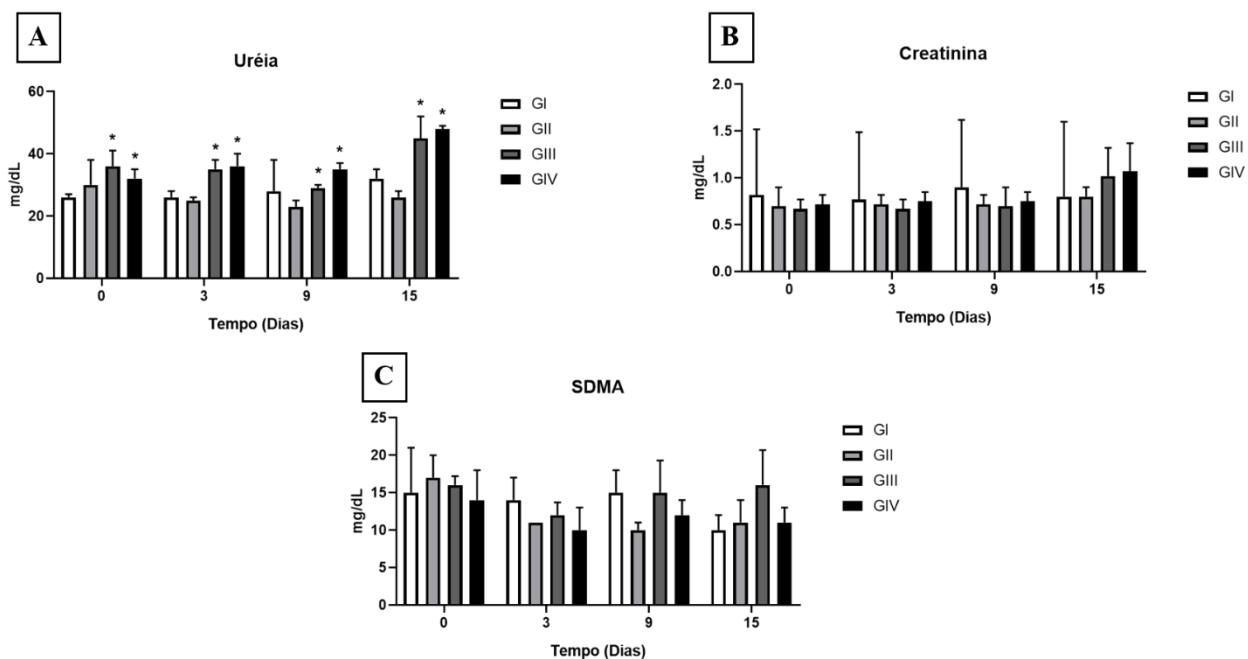
* $P < 0,05$: Teste de Tukey.

Valores de referência: Proteína total - 4,5-12,2 mg/dL; albumina - 2,5-5,0 mg/dL e, globulinas - 1,5-3,5 mg/dL, segundo Ozkan *et al.* (2012).

Figura 16 - Valores médios \pm desvio padrão de proteína, albumina e globulina 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.

Apesar de ter sido observada diferença significativa dos valores séricos de ureia nos animais dos GIII e GIV em todos os tempos estudados, isso não possui significado clínico, já que todos estão dentro do limite de normalidade para a espécie leporina de acordo com Carpenter *et al.*, (2012).

Em relação aos parâmetros creatinina e dimetilarginina simétrica (SDMA) também não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e tempos de análise (Figura 17), indicando ausência de injúria renal aguda.



* $P < 0,05$: Teste de Tukey.

Valores de referência

Ureia: 15-50 mg/dL; creatinina – 5,0-2,6 mg/dL, segundo Carpenter *et al.*, (2012).

SDMA: 0-14 μ g/dL, segundo IDEXX (2021).

Figura 17 - Valores médios da concentração de uréia, creatinina e SDMA 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.

A ureia e a creatinina são moléculas filtradas pelos glomérulos renais (Andreucci *et al.*, 2017). Qualquer distúrbio que cause diminuição na perfusão renal, filtração glomerular ou eliminação da urina eleva as concentrações dessas proteínas na corrente sanguínea (Benson e Paul-Murphy, 1999). Já foi demonstrado que o veneno da *Loxosceles* spp. pode atuar diretamente nos túbulos e glomérulos renais, ocasionando em edema glomerular e nefrose tubular, com consequente insuficiência renal aguda (Chaim *et al.*, 2006). Sabe-se também que, a hemoglobina plasmática liberada durante a hemólise intravascular no loxoscelismo cutâneo-visceral é uma das causas de insuficiência renal, além da mioglobina liberada durante o processo de rabdomiólise vista no loxoscelismo humano (Tavares *et al.*, 2004).

A SDMA é um aminoácido que tem sua origem da degradação proteica. Após a proteólise é liberada na circulação sanguínea e eliminada quase que exclusivamente pelos rins (Hall *et al.*, 2014). Esse método de análise foi recentemente introduzido com a proposta de diagnosticar precocemente a doença renal. Conforme Schwedhelm e Boger (2011), a eliminação renal desse aminoácido é igual ou superior a 90%. Além de sua eliminação ser principalmente pela filtração glomerular, a SDMA apresenta vantagem por não ser influenciada pela massa muscular e por

não sofrer reabsorção nos túbulos (Grauer, 2017). Outra das vantagens da SDMA quando comparado à creatinina, é que esse marcador detecta diminuição de função renal inferior a 30% enquanto a creatinina detecta a partir de 75%. Isso se dá devido a forte correlação da SDMA com a taxa de filtração glomerular permitindo que a diminuição da função renal possa ser precocemente identificada de modo a acompanhar a progressão da doença (Nabity *et al.*, 2015).

5.6 Avaliação histopatológica

No presente estudo, optou-se pela utilização do termo heterófilo para descrever as células polimorfonucleares envolvidas na inflamação aguda, como recomendado por literaturas de diagnóstico e patologia clínica em coelhos e pequenos mamíferos (Osglebee, 2020; Siegel e Walton, 2020) e pelos guias didáticos da *Joint Pathology Center (JPC)* para descrição histopatológica (JPC, 2019; JPC, 2016). Portanto, apesar de muitos trabalhos utilizarem a descrição de dermatite neutrofílica (Ospedal *et al.*, 2002), utilizou-se dermatite heterofílica (Pereira *et al.*, 2012).

Os achados histopatológicos após coloração com hematoxilina-eosina (HE), nos animais do grupo controle positivo (GII), que receberam apenas injeção intradérmica de veneno de *L. intermedia*, apresentaram características de dermatite e paniculite necrotizante e heterofílica focalmente extensa acentuada com hemorragia multifocal acentuada, que são compatíveis com o esperado em lesões associadas a *Loxosceles* (Ospedal *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2012) (Figuras 18 e 19). Foram visualizados também, trombose multifocal, edema moderado, formação de tecido de granulação e mineralização distrófica (Figura 19), assim como relataram Elston *et al.* (2000) e Ospedal *et al.* (2002).

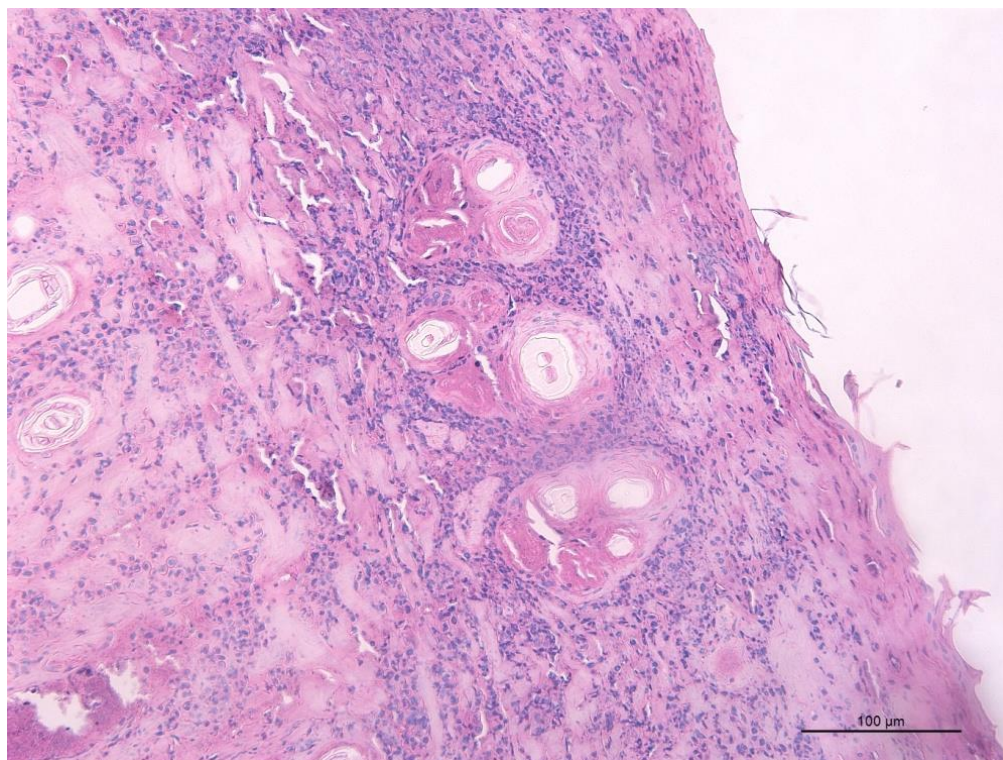


Figura 18: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Nota-se que na epiderme, derme superficial, profunda, se estendendo para hipoderme há áreas multifocais a coalescentes de necrose, perda tecidual com infiltrado inflamatório heterofílico acentuado.

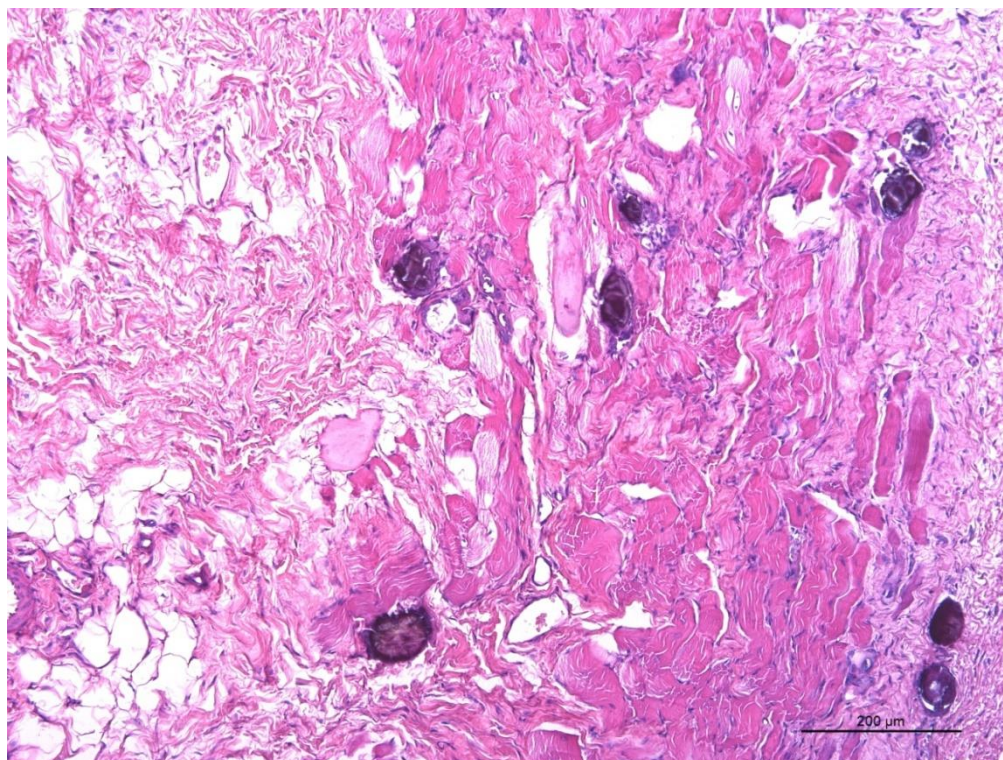


Figura 19: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Observam-se áreas multifocais de deposição de material basofílico vítreo, evidenciado a mineralização distrófica na avaliação final.

Os animais do grupo GI, que receberam somente injeção intradérmica de secretoma, não apresentaram alterações histológicas (Figura 20). Os resultados apontam que o secretoma não provoca danos aos tecidos, assim como visualizado macroscopicamente a ausência de lesões dermatológicas durante o estudo.

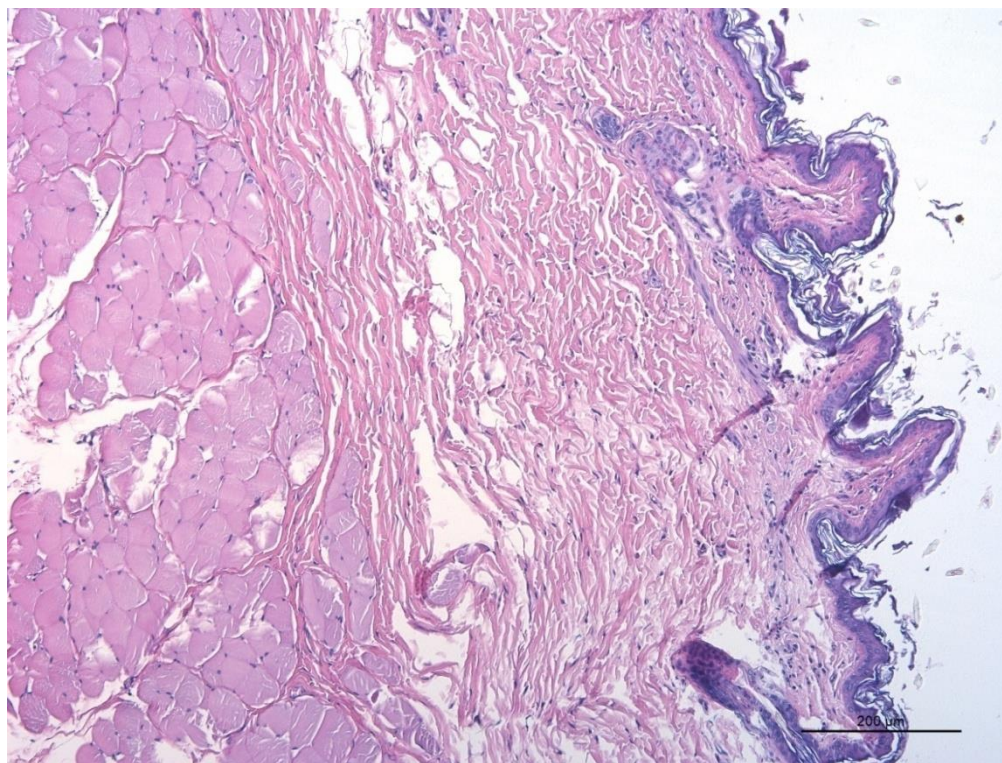


Figura 20: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se pele normal, sem alterações histológicas nas camadas da pele.

Os animais do grupo GIII, tratados com secretoma intradérmico em pontos equidistantes à injeção do veneno, apresentaram lesões histológicas similares ao grupo controle tratado com NaCl 0,9% (G1). A principal causa de lesões dermonecroticas observadas no loxoscelismo é a invasão heterofílica tecidual intensa (Figuras 21 e 22) (Smith e Micks, 1970; Silva *et al.*, 2004). Isso pode ser comprovado em todos os grupos deste estudo, exceto pelo G1. Foram descritos também no grupo GIII, numerosos vasos acentuadamente dilatados com lúmen preenchido por hemácias (hiperemia acentuada), afastamento das fibras de colágeno com acúmulo de material amorfo eosinofílico (edema) e áreas multifocais a coalescentes com inúmeras hemácias extravasadas (hemorragia acentuada), achados também observados por Elston *et al.* (2000) e Ospedal *et al.* (2002).

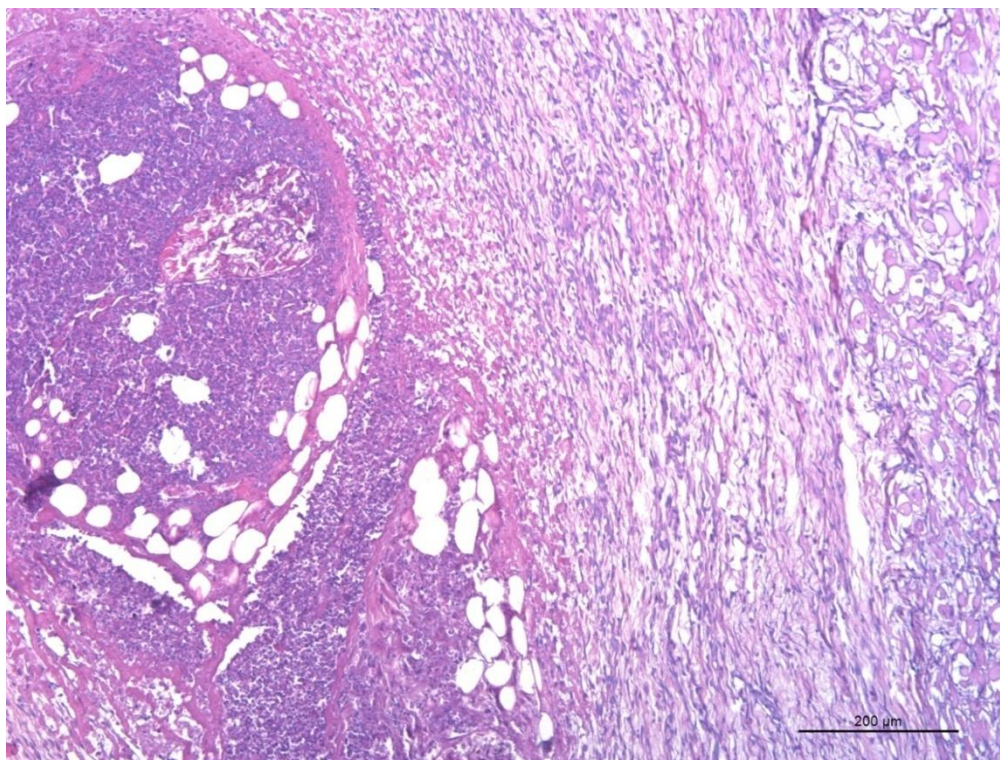


Figura 21: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se intenso infiltrado inflamatório heterofílico e necrose.

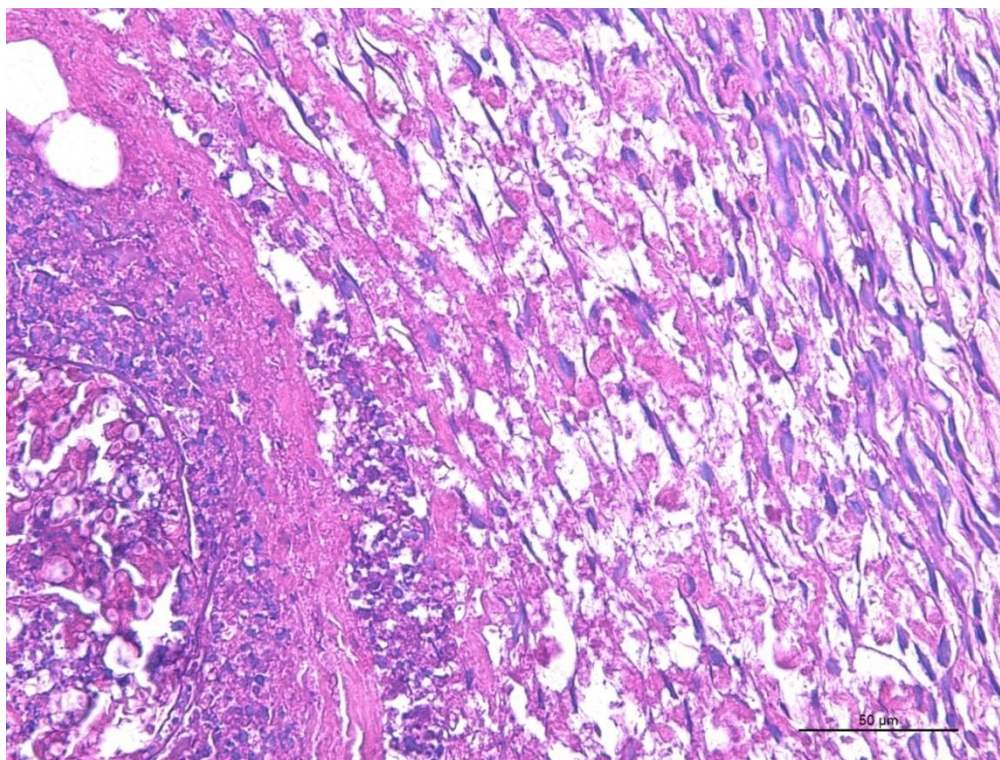


Figura 22: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se em maior aumento, o intenso infiltrado inflamatório heterofílico e necrose.

Os achados histopatológicos relacionados ao grupo GIV foram similares aos grupos GII e GIII. Observaram-se, dermatite e paniculite necrotizante e heterofílica focalmente extensa acentuada com hemorragia multifocal acentuada, trombose multifocal, mineralização distrófica, edema moderado e formação de tecido de granulação. Nestes animais, em apenas um foi verificada necrose em epiderme, enquanto todos os outros animais observou-se necrose a partir da derme profunda. Os animais de GIV apresentaram lesões menos evidentes macroscopicamente, sendo que apenas um desenvolveu escara dermonecrotica, entretanto, foram vistas infiltrações heterofílicas intensas em todos os animais. Isso pode ser explicado pelo efeito imunomodulador presente em CTMs, que atenuam a inflamação e reprogramam o sistema imune local, possibilitando a reparação tecidual e inibindo a formação de tecido fibrótico exuberante (Nauta e Fibbe, 2007; Jackson *et al.*, 2012). É realizada uma correlação com CTMs, pois o secretoma foi classificado por Gnecciet *al.* (2005), como moléculas tróficas liberadas por CTMs que mediam seus efeitos terapêuticos e reparos teciduais (Teixeira *et al.*, 2013). Um estudo piloto realizado por Sanchez-Castro *et al.*, (2021), mostram em seus resultados preliminares um potencial efeito benéfico do secretoma de CTMs sobre a mionecrose e hemorragia causado pelo veneno botrópico, indicando que o secretoma pode reduzir a extensão da mionecrose aguda e na extensão do dano muscular agudo, favorecendo uma resposta regenerativa bem-sucedida.

Todos os animais do grupo GIV apresentaram formação de tecido de granulação, composto por vasos pequenos e tortuosos perpendiculares à epiderme (angiogênese) e proliferação de fibroblastos com formação colagênica paralela à superfície epidérmica (fibroplasia). Dentre os grupos estudados, o GIV foi o único em que todos os animais apresentaram tecido de granulação, angiogênese e fibroplasia na histopatologia (Figura 23 e 24). A fibroplasia é considerada o marco principal do processo de cicatrização, sendo um evento marcado pela migração de fibroblastos na ferida em decorrência da liberação de mediadores químicos produzidos principalmente por macrófagos, tais como, fator de crescimento transformante-alfa (TGF- α). Tais grupos celulares são os principais componentes do tecido de granulação e tem como função fundamental a produção de colágeno que formará o tecido conjuntivo, substituindo a matriz extracelular provisória por um tecido mais forte e elástico, aumentando a resistência tecidual (Hatanaka e Curi, 2007). Hartlapp *et al.* (2001) afirmaram que a neovascularização possibilita a formação de condições essenciais para que os processos metabolicamente ativos evoluam em sua plenitude. O tecido lesionado é preenchido então por um tecido hiperplásico, o tecido de granulação, que é composto principalmente por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina,

ácido hialurônico e colágenos tipos I e II, como visto por Breitbart *et al.* (2001) e Sahota *et al.* (2004).

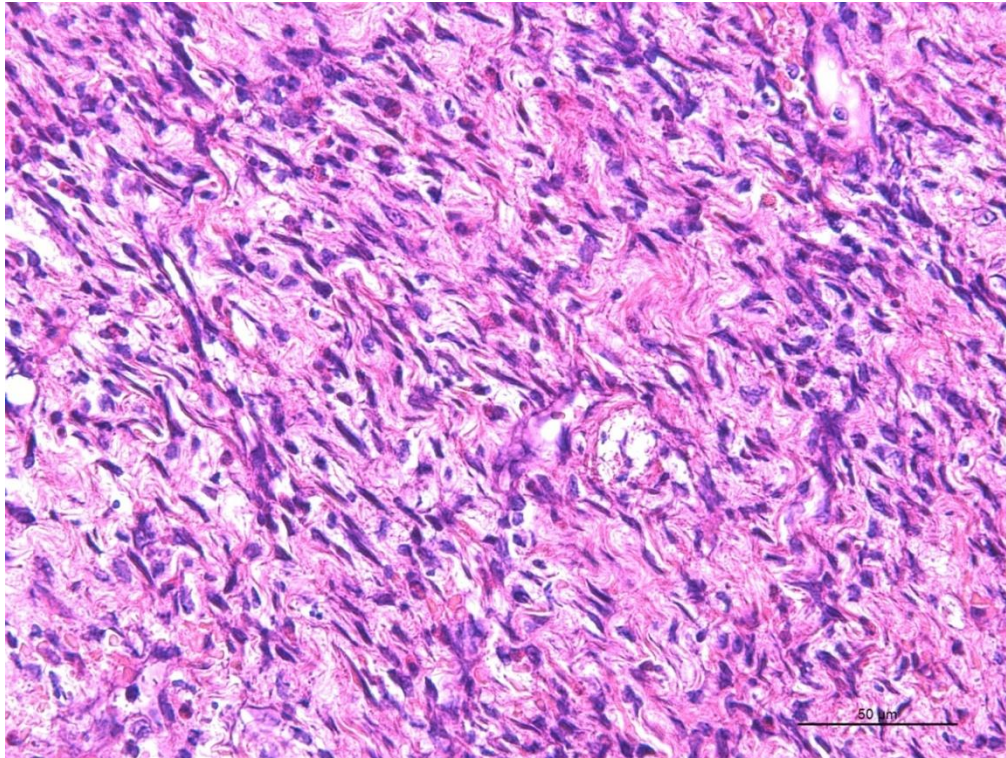


Figura 23: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Visualiza-se fibras colágenas, caracterizando o tecido de granulação.

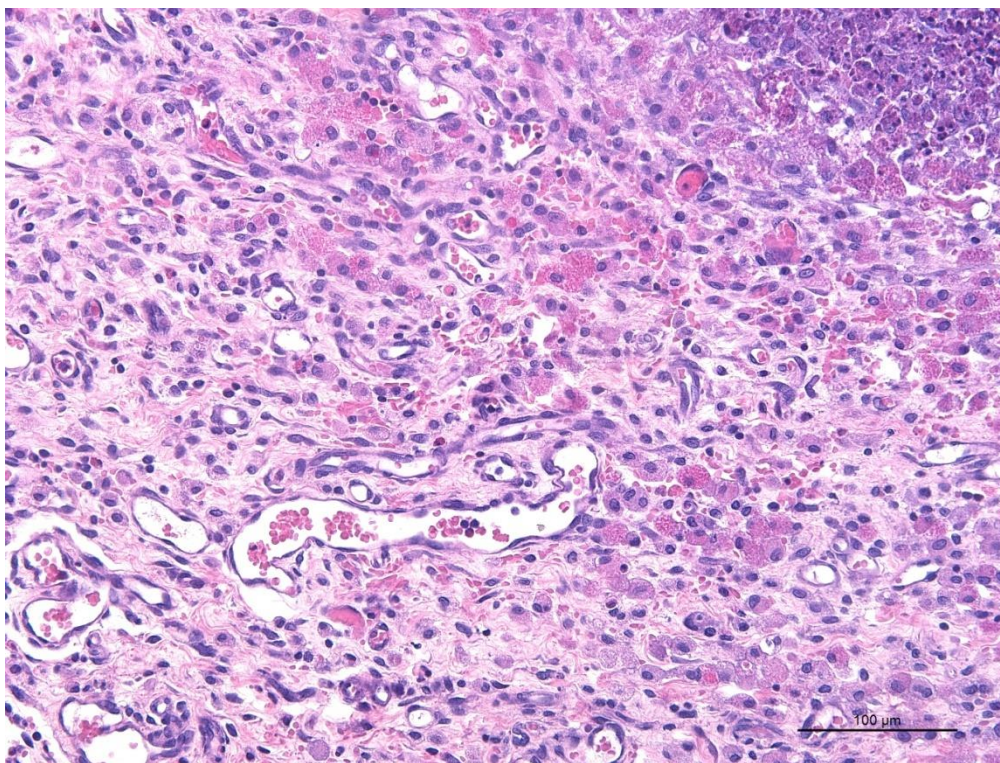


Figura 24: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles intermedia*, após coloração HE. Notam-se tecido de granulação, infiltrado inflamatório heterófilico e angiogênese.

Sugere-se que o protocolo terapêutico instituído de secretoma por via intravenosa, proporcionou redução da inflamação aguda devido a não formação de escara necrótica em metade dos animais, bem como promoveu a ativação fibroblástica, desenvolvimento precoce de tecido conjuntivo, neovascularização e reepitelização tecidual, conferindo alternativa comprovadamente eficaz em relação ao processo de cicatrização.

Salienta-se que é a primeira vez que se utiliza o secretoma das CTMs como tratamento da lesão dermonecrotica do loxoscelismo cutâneo. Estudos posteriores, especialmente em relação as concentrações e tempos devam ser realizados para o tratamento de feridas advindas do veneno de *Loxosceles*.

6. CONCLUSÕES

A dose utilizada neste trabalho de 10 μ g de veneno de *L. intermedia* foi capaz de induzir dermonecrose. As lesões dermonecróticas apresentaram-se muito semelhantes às observadas em acidentes naturais que ocorrem em humanos e em pequenos animais.

Os resultados hematológicos e bioquímicos não demonstraram alterações compatíveis com o loxoscelismo sistêmico, embora algumas variações tenham ocorrido nos tratamentos que utilizaram o veneno em conjunto com o secretoma.

O tratamento com secretoma não evitou a formação de edema e eritema no ponto de inoculação de veneno *L. intermedia*, todavia somente um animal apresentou necrose.

Microscopicamente, os animais desafiados com veneno de *L. intermedia* e tratados com secretoma via endovenosa apresentaram ativação fibroblástica, desenvolvimento precoce de tecido conjuntivo, neovascularização e reepitelização tecidual, conferindo melhoria significativa no processo de cicatrização de feridas dermonecróticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R.M.G.; LOURENÇO, W.R; TAMBOURGI, D.V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, sicariidae). *The Journal of Arachnology*, v. 28, p. 245-247, 2000.
- ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.O. *et al.* Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, v. 37, n. 4, p.627-632, 1999.
- ANDRADE, S.A; MURAKAMI, M.T; CAVALCANTE, D.P. *et al.* Kinetic and mechanistic characterization of the sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, v. 47, p. 380-386, 2005.
- ANDREUCCI, M; FAGA, T; PISANI, A. *et al.*, The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice. *European Journal of Internal Medicine*, v. 39, p. 1–8, 2017.
- ATALAN, G; ATALAN, G; EROL, H. *et al.* Comparison of systemic effects of midazolam, ketamine, and isoflurane anaesthesia in rabbits. *Journal of Veterinary Research*, v. 63, n. 2, p. 275-283, 2019.
- BALBINO, C.A; PEREIRA, L.M; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmac~euticas*, v. 41, n. 1, p. 27-51, 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.; LIRA, M.S.; ARAUJO, C.A., *et al.* Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon*, v. 56, p. 972–979, 2010.
- BARBARO, K.C; 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.
- BARBUL, A. History of wound healing. In: BRUNICARDI, F.C.; SEYMOUR, I.; SCHWARTS, D.L.; DUN, D.K.; ANDERSEN, R.E. *Schwartz's Surgery*. Ontario: Companion Handbook, p. 25-78, 2006.

BARI, E; FERRAROTTI, I; SARACINO L. *et al.* Mesenchymal stromal cell secretome for severe COVID-19 infections: premises for the therapeutic use. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 924, 2020.

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? *Annals of Emergency Medicine*, v. 24, n. 1, p. 21-25, 1994.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M.S. *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v. 16, p. 585-601, 2008.

BASCUR, L; YEVENES, I; BARJA, P. Effects os *Loxosceles laeta* spider venom on blood coagulation. *Toxicon*, v. 20, n. 4, p. 795-796, 1983.

BEER, H.D.; FASSLER, R.; WERNER, S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. *Vitamins and Homones*, v. 59, p. 217-239, 2000.

BOIA-FERREIRA, M., MORENO, K.G., BASÍLIO, A.B.C. *et al.* TCTP from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom contributes to the allergic and inflammatory response of cutaneous loxoscelism. *Cells*, v. 8, p. 1489, 2019.

BREITBART, A.S.; GRANDE, D.A; LASER, J.; *et al.* Treatment of ischemic wounds using cultured dermal fibroblasts trasuced retrovirally with PDGF-B and VEGF genes. *Annals of Plastic Surgery*, v. 46, n. 5, p. 555-561, 2001.

BYDŁOWSKI, S.P; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M. *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009.

CACHIA, M.; MERCIÉCA, L.; AZZOPARDI, C. *et al.* Rare case of dermonecrosis caused by a recluse spider bite in Europe. *Case Reports*, v. 2016, p. bcr2016215832, 2016.

CACY, J.; MOLD, J.W. The clinical characteristics of brown recluse spider bites treated by family physicians: an OKPRN Study. Oklahoma Physicians Research Network. *The Journal of Family Practice*, v. 48, p. 536-542, 1999.

CARPENTER, J.W. *Exotic Animal Formulary*, 4^{ed}. Elsevier, p. 744, 2012.

CETINKAYA, A; AYDIN, K; SIRAKAYA, A. *et al.* A loxoscelism case received therapeutic apheresis and hyperbaric oxygen therapy. *Saudi Medical Journal*, v. 41, n. 12, p. 1364-1368, 2020.

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; DA SILVEIRA. *et al.* Brown spider dermonecrotic toxin directly induces neprotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAMBERLAIN, G.; JAMES F.; BRIAN, A; JIM, M. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

CHATZAKI, M.; HORTA, C.C.; ALMEIDA, M.O. *et al.* Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. *Toxicon*, v. 60, p. 21-30, 2012.

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

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

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

CORDEIRO, F.A.; AMORIM, F.G; ANJOLETTE, F.A. *et al.* Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 21, p. 1-14, 2015.

DA SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y; DOS SANTOS, F. *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, n. 2, p. 155-161, 2003.

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

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

DANTAS, A.E.; HORTA, CC.; MARTINS, T.M. *et al.* Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3,-6,-7, and -9 in human primary skin fibroblasts. *Toxicon*, v. 84, p. 56-64, 2014.

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.

DAVANZO, F.; REBUTTI, I.; PANZAVOLTA, G. *et al.* Loxoscelism: proposal of a new protocol for treatment. *Journal Clinical of Case Report*, v. 6, n.3, p. 1000738, 2016.

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

DELASOTTA, L.A.; OROZCO F.; ONG, A. *et al.* Surgical treatment of a brown recluse spider bite: a case study and literature review. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, v. 53, p. 320-323, 2014.

DENNY, W.F. DILLAHA, C.L.; MORGAN, P.N. Hemotoxic effect of *Loxsoceles reclusus* venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 64, p. 291-298, 1964.

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

DILLAHA, C.J.; JANSEN, G.T.; HONEYCUTT, W.N. *et al.* North American loxoscelism: necrotic bite of the brown recluse spider. *Jama*, v. 188, n. 1, p. 33-36, 1964.

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.

DUNCAN, R.P.; RYNERSON, M.R.; RIBERA, C. *et al.* Diversity of *Loxosceles* spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the *Loxosceles rufescens* lineage. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 55, n. 1, p. 234-248, 2010.

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

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. *Archives of Dermatology*, v. 141, p. 595-597, 2005.

FARACE, F.; LISSIA, M.; MELE, A. *et al.* Local cutaneous arachnidism: a report of three cases and their management. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, v. 59, n. 2, p. 197-201, 2006.

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

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. *Lippincott Williams & Wilkins*, p. 1311, 2000.

FERNANDES-PEDROSA M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.; GONÇALVES, R.M. *et al.* Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics*, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2008.

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

- FERRER, V.P.; DE MARI, T.L.; GREMSKI, L.H. *et al.* A novel hyaluronidase from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 5, p. e2206, 2013.
- FINGERMANN M.; DE ROODT A.R.; CASCONI, O. *et al.* Biotechnological potential of phospholipase D for *Loxosceles* antivenom development. *Toxicon: X*, v. 6, p. 100036, 2020.
- FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, v. 34, p. 415-423, 2005.
- FRANÇA, F.O.; BARBARO, K.C.; ABDULKADER, R.C. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, p. 287-290, 2002.
- FRANK, S.; MADLENER, M.; WERNER, S. Transforming growth factors B1, B2 and B3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *Journal of Biology Chemistry*, v. 271, n. 17, p. 10188-10193, 1996.
- FUKUSHIMA, C.S.; ANDRADE, R.M.G.; BERTANI, R. Two new Brazilian species of *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 with remarks on amazonica and rufescens groups (*Araneae, Sicariidae*). *Zookeys*, v. 667, p. 67-94, 2017.
- FUTRELL J.M. Loxoscelism. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 304, p. 261-267, 1992.
- GERTSCH, W.J. & ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America, and the West Indies (*Araneae, Loxoscelidae*). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 175, p. 264-360, 1983.
- GIL, A.G.; SILVÁN, G.; ILLERA, J.C. Pituitary-adrenocortical axis, serum serotonin and biochemical response after halothane or isoflurane anaesthesia in rabbits. *Laboratory Animals*, v. 41, n. 4, p. 411-419, 2007.
- GNECCHI, M.; HUAMEI, H.; LIANG, O. *et al.* Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Medicine*, v. 11, n. 4, p. 367-368, 2005.

- GOMEZ, H.F.; MARK J.M.; JOSEPH W. *et al.* Intradermal anti-Loxosceles Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. *Academic Emergency Medicine*, v. 6, n. 12, p. 1195-1202, 1999.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SCHEFFER, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. In: González, F.H.D. Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do rio Grande do Sul. p. 73-89, 2003.
- GRAUER, G.F. Diretrizes de tratamento para doença renal crônica em cães e gatos. *IRIS* (International Renal Interest Society), 2017.
- GREMSKI, L.H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. *et al.* Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*, v. 83, p. 91-120, 2014.
- GREMSKI, L.H.; DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M. *et al.* A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Molecular BioSystems*, v. 6, n. 12, p. 2403-2416, 2010.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.
- HALL, J.A.; YERRAMILI, M.; OBARE, E.; *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *The Veterinary Journal*, v. 202, n. 3, p. 588–596, 2014.
- HALLORAN, C.M.; SLAVIN, J.P. Pathophysiology of Wound Healing. Surgery (Oxford). *The Medicine Publishing Company Ltd.* v. 5, 2002.
- HARTLAPP, I.; ABR, R.; SAEED, R.W.; *et al.* Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultures endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *The FASEB Journal*, v. 15, n.1 2, p. 2215-2224, 2001.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Farmacologia*, São Paulo, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HEDLUND, C.S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T. W. Cirurgia de pequenos animais. 3ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Cap. 15, p.159-161.

HOCKING, A.M.; GIBRAN, N.S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Experimental Cell Research*, v. 316, n. 14, p. 2213-2219, 2010.

HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old Obstacles, New Directions. *Annals of Emergency Medicine*, v. 44, p. 608-624, 2004.

HOSGOOD, G. Reparo de Feridas e Resposta Tecidual Específica à Lesão. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. New York: Elsevier Science, Cap. 4, p. 66-86, 2003.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v. 36, p. 667-685, 2006.

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. *Internal Medicine Journal*, v. 34, n. 1, p. 38-44, 2004.

JACKSON, W.M.; NESTI, L.J.; TUAN, R.S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cel. Research Therapy*, v. 3, n. 20, p. 1-9, 2012.

JPC. *Joint Pathology Center*. Wednesday Slide Conference Online: Conference: 12 - 2019 Case: 04 .2019. Disponível em <https://www.askjpc.org/wsco/wsc_showcase4.php?id=SzYybStSV3k0NmhlR0ZIN0tsT0lpZz09> Acesso em 24 de setembro de 2020.

JPC. *Joint Pathology Center*. Wednesday Slide Conference Online: Conference: 2 - 2016 Case: 1. 2016. Disponível em <https://www.askjpc.org/wsco/wsc_showcase4.php?id=d3FwL0lBVTBzWk43TitLN0pqQmVUUT09> Acesso em 24 de setembro de 2020.

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

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. *Academic Press*, p. 916, 2008.

KERN, S.; HERMANN, E.; JOHANNES, S. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, p 1294-1301, 2006.

KIM, J.W.; LEE, J.H.; LYOO, Y.S. *et al.* The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary Dermatology*, v. 24, p. 242-253, 2013.

KIM, K.H.; BLASCO-MORENTE, G.; CUENDE N., ARIAS-SANTIAGO, S. Mesenchymal stromal cells: properties and role in management of cutaneous diseases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 31, n. 3, p. 414-423, 2017.

KOH, T.J.; DIPIETRO, L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert. Rev. Mol. Med*, v. 13, p. 1-12, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflammation. In: Robbins & Cotran. Pathologic Basis of Disease. *Elsevier Saunders*, p.47-118, 2005.

LAU, K.; PAUS, R.; TIEDE, S. *et al.* Exploring the role os stemwound healing. *Experimental Dermatology*, v. 18, p. 921-933, 2009.

LAWRENCE, W.T; DIEGELMANN, R.F. Growth factors in wound healing. *Clinics in Dermatology*, v. 12, p. 157-69, 1994.

LI, Y.; YANG, W.; ZHANG, Q.*et al.* An Update on the Potential of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Diseases. *Stem Cells International*, 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. 87p. Dissertação (Mestrado Bioquímica e Imunologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOMONTE, B. Tissue damage and inflammation induced by snake venoms. 1994. 170p. TeseDoutorado - Department of Clinical Immunology, University of Göteborg, Göteborg, Sweden.

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

LOPES, P.H.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C.; MARQUES, T. *et al.* Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. *Archives of Toxicology*, v. 94, n. 5, p. 1461-1477, 2020.

LUCATO, R.V. Jr.; ABDULKADER, R.C.; BARBARO K.C. *et al.* *Loxosceles gaucho* venom-induced acute kidney injury- *in vivo* and *in vitro* studies. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 5 p. 11-82, 2011.

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

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

MAGALHÃES, I.L.; BRESCOVIT, A.; SANTOS, A. Phylogeny of Sicariidae spiders (Araneae: Haplogynae), with a monograph on Neotropical Sicarius. *Zoological Journal da Linnean Society*, v. 179, p. 767-864, 2017.

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

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

MARTINS, D.C.G. *Tratamento da lesão dermonecrótica induzida pelo veneno de Loxosceleslaeta com dapsona e células-tronco mesenquimais*. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado

em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS, P.D.E.; UEBEL, C.O.; MACHADO, D.C. *et al.* Adipose tissue mature stem cells in skin healing: a controlled randomized study. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, v. 26, n. 3, p. 394-401, 2011.

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

MCDADE, J.; AYGUN, B.; WARE, R.E. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation leading to acute hemolytic anemia in six adolescents. *Journal of Pediatrics*, v. 156, p. 155-157, 2010.

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. *Clinical Laboratory Science Journal*, v. 20, n. 2, p. 99-105, 2007.

MELO, M.M.; SILVA JUNIOR, P.G.P.; JUNIOR, D.V. *et al.* Aracnismo. *Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia*, n. 44, p. 98-107, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021. Acidentes por animais peçonhentos- notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação - SINAN (Sistema de Informação de Agravos Notificáveis). Disponível em <<http://www.saude.gov.br/sinanweb>>.

MOURA, J.F. *Caracterização imunoquímica e molecular da fração dermonecrótica do veneno da aranha marrom Loxosceles intermedia*. Belo Horizonte, 2005.146p. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Departamento de farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; ANDRADE, S.A. *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 342, p. 323–329, 2006.

MUSHAHARY, D.; SPITTLER, A.; KASPER, C. *et al.* Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, v. 93, n. 1, p. 19-31, 2018.

NABITY, M.B.; LEES, G.; BOGGEES, M. *et al.* Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 4, n. 29, p. 1036-1044, 2015.

NAMBU, M.; KISHIMOTO, S.; SHINGO, N. *et al.* Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Annals of Plastic Surgery*, v. 62, n. 3, p. 317-321, 2009.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, *The American Society of Hematology*, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, 2007.

NENTWIG, W. Introduction, establishment rate, pathways and impact of spiders alien to Europe. *Biological invasions*, v. 17, p. 2757-2778, 2017.

NEULANDS, G., ATKINSON, P. Review of southern African spiders of medical importance, with notes on the signs and symptoms of envenomation. *South African Medical Journal*, v. 73, n. 4, p. 235-239, 1988.

OGLESBEE, B.L. Rabbits in: HEATLEY, J.J.; RUSSELL, K.E. *Exotic Animal Laboratory Diagnosis*. John Wiley & Sons, Inc. 63-79. 2020.

OLIVEIRA, S.T.; LEME, M.C.; PIPPI, N.L. *et al.* Preparations of comfrey (*Symphytum officinale*) on cutaneous wound healing in rats. *Revista da FZVA*, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2000.

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

PAES, P.R.; LEME, O.P.; CARNEIRO, R.A. Hematologia dos Animais Domésticos. Primeira Ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009.

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, n. 6, p. 660-671, 2009.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C. *et al.* The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon*, v. 48, n. 2, p. 123-137, 2006.

PAVLETIC, M.M. Basic principles of wound healing. In: Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery. 3ed. Ames: Wiley- Beckwell, Cap 2, p.18-29, 2010.

PERANTEAU, W.H.; ZHANG, L.; MUVARAK, N. *et al.* II-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult modelo of scar formation. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 128, n. 7, p. 1852-1860, 2008.

PEREIRA, N.B.; KALAPOTHAKIS, E.; VASCONCELOS, A.C. *et al.* Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 18, n. 3, p. 277-286, 2012.

PETERSON, M.E. Brown Spider Envenomation. *Clinical techniques in small animal practice*, 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. *Annals of Emergency Medicine*, v .25, n. 3, p. 363-368, 1995.

PIPPIRS, U.; MEHLHORN, H.; ANTAL, A.S. *et al.* Acute generalized exanthematous pustulosis following a *Loxosceles* spider bite in Great Britain. *The British Journal of Dermatology*, v. 161 p. 208-9, 2009.

PIRES, A.O.; MENDES-PINHEIRO, B.; TEIXEIRA, F. *et al.* Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis. *Stem Cells and Development*, v. 25, n. 14, p. 1073-1083, 2016.

PLATNICK, N.I. 2013. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History. Disponível em: <<https://ci.nii.ac.jp/naid/10022018681/>>. Acesso em: 19/04/2021.

POLLI, N.L.C.. *Proteção contra os efeitos tóxicos do veneno de aranhas do gênero Loxosceles utilizando fosfolipases-D mutadas recombinantes como antígeno*. 2020. Dissertação (Mestrado

em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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/>

RAJA, S.K.; GARCIA, M.S.; ISSEROFF, R.R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in Bioscience*, v. 12, p. 2849–68, 2007.

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. *Annals of Surgery*, v. 202, n. 5, p. 659-663, 1985.

REINKE, J.M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, v.49, p.35- 43, 2012.

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.

RITCHIE, R.F.; PALOMAKI, G.E.; NEVEUX, L.M. *et al.* Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin, and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *Journal of Clinical Laboratory Analyses*, v. 12, n.6, 1999.

ROBERT, A.; GOMES, F.; RODE, M. *et al.* The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *Journal of Tissue Engineering*, v. 10, p. 2041731419833391, 2019.

ROJAS, J.M.; ARÁN-SEKUL, T.; CORTÉS, E. *et al.* Phospholipase D from *Loxosceles laeta* spider venom induces IL-6, IL-8, CXCL1/GRO- α , and CCL2/MCP-1 production in human skin fibroblasts and stimulates monocytes migration. *Toxins*, v. 9, n. 4, p. 125, 2017.

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

RUBENSTEIN, E.; STOEBNER, P.E.; HERLIN, C. *et al.* Documented cutaneous loxoscelism in the south of France: an unrecognized condition causing delay in diagnosis. *Infection*, v. 44, n. 3, p. 383-387, 2016.

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

SAHOTA, P.S.; BURN, J.L.; BROWN, N.J., *et al.* Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin. *Wound Repair and Regeneration*, v. 12, n. 6, p. 635-642, 2004.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora, 2007.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L. *et al.* Necrotic arachnidism. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 44, n. 4, p. 561-576, 2001.

SANCHEZ-CASTRO, E. Eduardo *et al.* Mesenchymal Stromal Cell-based therapies as promising treatments for muscle regeneration after snakebite envenoming. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 609961, 2020.

SCADDEN, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, v. 441, n. 7097, p. 1075- 1079, 2006.

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

SCHWARZSCHILD, K. Um curso de cálculo. *Editora LTC*, v. 4, p. 481, 1996.

SCHWEDHELM, E.; BOGER, R. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nature Reviews - Nephrology*, v. 7, p. 275-285, 2011.

SCOTT, D.W. Structure and function of the skin. In: Muller and Kirk's small animal dermatology. *Philadelphia: Saunders*, v. 6, p-1-70, 2000.

- SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; KOWLASKI, L. *et al.* A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, p. 546-548, 1998.
- SIEGEL, A.; WALTON, R.M. Hematology and biochemistry of small mammals. *Ferrets, Rabbits, and Rodents*, p. 569, 2020.
- SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; DOS SANTOS, F.A. *et al.* Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, v. 42, p. 155-161, 2003.
- SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H. *et al.* Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, v. 44, p. 693-709, 2004.
- SILVESTRE, F.G.; CASTRO, C.S.D.; MOURA, J.F.D. *et al.* Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon*, v. 46, p. 927-936, 2005.
- SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.
- SMITH, C.W.; MICKS, D.W. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider. *Laboratory Investigation*, v. 22, p. 90-93, 1970.
- SOUZA, A.L.; MALAQUE, C.M.; SZTAJNBOK, J. *et al.* *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. *Toxicon*, v. 51, p. 151-156, 2008.
- SUN, J.Y.; ZHANG, Y.F.; SONG, X.J. *et al.* The healing effects of conditioned medium derived from mesenchymal stem cells on radiation-induced skin wounds in rats. *Cell Transplantation*, v. 28, n. 1, p. 105-115, 2019.
- SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Bites of brown recluse spiders and suspected necrotic arachnidism. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 7, p. 700-707, 2005.
- SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. *Clinics in Dermatology*, v. 24, p. 213-221, 2006.

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

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

TAVARES, F.L.; SOUZA-E-SILVA, M.C.C.; SANTORO, M.L. *et al.* Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Human & Experimental Toxicology*, v. 23, n.1 0, p. 477-486, 2004

TAZIMA, M.; ANDRADE, Y.; MORIYA, T. Wound biology and healing. Simpósio: Fundamentos em clínica cirúrgica, v. 41, p. 259-64, 2008.

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

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

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W., *et al.* Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca Ltda, p. 228, 2007.

TOYSERKANI, N.M.; MARLENE L.C.; SØREN P. S. *et al.* Adipose-derived stem cells: new treatment for wound healing? *Annals of Plastic Surgery*, v. 75, n. 1, p. 117-123, 2015.

TROCINO, A.; ZOMENO, C.; BIROLO, M. *et al.* Impact of pre-slaughter transport conditions on stress response, carcass traits, and meat quality in growing rabbits. *Meat Science*, v. 146, p. 68-74, 2018.

VALDEZ-MONDRAGÓN, A.; NAVARRO-RODRÍGUEZ, K.P.S.C., *et al.* Under an integrative taxonomic approach: the description of a new species of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae) from Mexico City. *Zookeys*, v. 892, p. 93-133, 2019.

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

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

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

VIZOSO, F.; EIRO, N.; CID, S. *et al.* Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 9, p. 1852, 2017.

WORLD SPIDER CATALO. *World Spider Catalog*, v. 21.0, 2020.

WRIGHT, S.W.; WRENN, K.D.; MURRAY, L. *et al.* Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite. *Annals of Emergency Medicine*, v. 30 p. 28-32, 1997.

YIANNIAS, J.A.; WINKELMANN, R.K. Persistent painful plaque due to a brown recluse spider bite. *Cutis*, v. 50, p. 273–275, 1992.

ZAKRZEWSKI, W.; DOBRZYŃSKI, M.; SZYMONOWICZ, M. *et al.* Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 10, n. 1, p. 1-22, 2019.



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