

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-graduação**

**TRATAMENTO DA LESÃO DERMONECRÓTICA INDUZIDA
PELO VENENO DE *LOXOSCELES LAETA* COM DAPSONA E
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

GUILHERME DE CARO MARTINS

GUILHERME DE CARO MARTINS

**TRATAMENTO DA LESÃO DERMONECRÓTICA INDUZIDA PELO
VENENO DE *LOXOSCELES LAETA* COM DAPSONA E CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS**

Dissertação que foi 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

2014

À minha família sempre presente
Aos meus amigos e a todos que me apoiaram, contribuíram e “escreveram” comigo essa
dissertação.....
.....dedico

LISTA DE ABREVIACÕES

AST- aspartato aminotransferase
CHGM- concentração de hemoglobina globular média
CK- creatinaquinase
CK-MB- creatinaquinase fração MB
CN- controle negativo
CP- controle positivo
CTGF-fator de crescimento do tecido conjuntivo
CTMs- células-tronco mesenquimais
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA- ácido etilenoaminotetracético
EGF- fator de crescimento epidermal
EV-UFGM- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
FGF- fator de crescimento fibroblástico
HE- hematoxilina-Eosina
HGM- hemoglobina globular média
IDO- indoleamine 2,3-dioxygenase
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
MTT- tetrametiliazólio

PAF- fator ativador de plaquetas
PBS- tampão fosfato-salino
PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas
SDS- dodecil sulfato de sódio
SFB- soro fetal bovino
SITC- Sociedade Internacional para Terapia Celular
SMASE-D- esfingomielinase D
TGF- β 1- fator de crescimento transformador - β 1
TGF- β 2- fator de crescimento transformador- β 2
TIMP- fator inibidor tecidual das metaloproteinases da matriz
TNF- α - fator de necrose tumoral- α
TP- tempo de protrombina
TTPa- tempo de tromboplastina parcialmente ativada
VEGF-A- fator de crescimento endotelial vascular
VGM- volume Globular Médio

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. <i>Loxosceles</i>	17
2.1.1. Aspectos biológicos	17
2.1.2. Caracterização do veneno	19
2.1.3. Sinais clínicos	21
2.1.3.1. Sinais cutâneos	21
2.1.3.2. Sinais sistêmicos	22
2.1.3.3. Alterações histopatológicas	24
2.2. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	25
2.2.1. Fase de hemostasia	26
2.2.2. Fase inflamatória e desbridamento	27
2.2.3. Fase proliferativa	28
2.2.4. Fase de maturação e remodelamento	29
2.3. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO	29
2.3.1. Dapsona	31
2.4. TERAPIA CELULAR	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS	35
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	36
3.3. INOCULAÇÃO DO VENENO	37
3.4. TRATAMENTO	38
3.5. EXTRAÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	38
3.5.1. Tripsinização das células-tronco mesenquimais	39
3.5.2. Ensaios de viabilidade celular	39
3.5.3. Ensaios de diferenciação <i>in vitro</i> das CTMs	40
3.6. COLETAS DE SANGUE E ANÁLISE LABORATORIAIS	42
3.6.1. Avaliação hematológica	42
3.6.2. Coagulograma	42

3.6.3. Avaliação bioquímica	43
3.7. AVALIAÇÃO DA ÁREA DAS FERIDAS	43
3.8. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES	43
3.8.1. Avaliação da morfologia tecidual por hematoxilina-eosina	44
3.8.2. Avaliação da fibrose pela coloração com tricrômico de Massom	44
3.8.3. Diferenciação de fibras colágenas pela coloração com Picro-sirius Red	44
3.8.4. Avaliação da calcificação tecidual por von Kossa	45
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Seleção dos animais e dose de veneno inoculado	46
4.2. Transplante das células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo	46
4.3. Avaliação hematológica	47
4.4. Coagulograma	51
4.5. Avaliação bioquímica	52
4.6. Avaliação das feridas	59
4.6.1. Avaliação morfométrica e obtenção do percentual de contração das feridas	60
4.7. Avaliação histopatológica das lesões	63
4.7.1. Avaliação das fibras colágenas	65
5. CONCLUSÕES	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Sequência de procedimentos realizados na região interescapular de todos os coelhos da raça Nova Zelândia para aplicação do veneno de *Loxosceles laeta*. A) Foto demonstrando o momento imediatamente posterior à tricotomia da região interescapular; B) Antissepsia com clorexidine 0,5%, imediatamente antes da aplicação do veneno; C) Aplicação de 0,2 ml de uma solução contendo 20 µg de veneno de *L.laeta* com seringa de insulina (100u.i) por via intradérmica; D) Aspecto da pele logo após a injeção do veneno (seta), em que se nota a formação de uma vesícula temporária, confirmando a aplicação intradérmica do veneno.
- Figura 2** Retirada de tecido adiposo da região interescapular em coelhos Nova Zelândia para posterior isolamento das células-tronco mesenquimais. A) Exposição do tecido adiposo após incisão de pele. B) Retirada do tecido adiposo para posterior isolamento das células-tronco mesenquimais.
- Figura 3** Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas de tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia indiferenciadas e submetidas à diferenciação induzida *in vitro*. A) CTMs indiferenciadas cultivadas de forma usual e utilizadas como controle dos ensaios de diferenciação (400X). B) CTMs cultivadas em meio adequado para indução de diferenciação adipogênica após coloração com *Oil Red* (400X). Observam-se as gotículas de gordura coradas em vermelho. C) CTMs cultivadas em meio adequado para indução de diferenciação osteogênica após coloração com von Kossa (400X). Observa-se matriz mineralizada com coloração amarronzada.
- Figura 4** Traçado eletroforético das proteínas plasmáticas dos coelhos em que

observam-se seis bandas distintas: a) albumina, b) alfa-globulinas 1, c) alfa-globulinas 2, d) beta-globulinas 1, e) beta-globulinas 2, f) gama globulinas.

Figura 5 Evolução da ferida dermonecrótica de coelhos Nova Zelândia após inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*. A) Ferida com halo hemorrágico evidente quatro horas após a inoculação de veneno. B) Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose azulada, 48 horas após a inoculação do veneno. C) Ferida dermonecrótica com uma crosta bem definida, quatro dias após a inoculação do veneno. D) Ferida dermonecrótica no último dia de avaliação, observa-se que a crosta está pouco aderida à pele.

Figura 6 Gráfico de linhas demonstrando a porcentagem de contração das feridas dermonecróticas em coelhos de acordo com o tratamento instituído até o 12º dia após inoculação de 20µg de veneno de *Loxosceles laeta*. CN= inoculação de água ultrapura, CP= inoculação do veneno e tratamento com PBS, DAP= inoculação do veneno e tratamento com dapsona, CTMs= inoculação do veneno e tratamento com células-tronco mesenquimais, DAP+ CTMs= inoculação do veneno e tratamento com dapsona+ células-tronco mesenquimais.

Figura 7 Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *L. laeta* após coloração especial com von Kossa (100x). Notam-se múltiplos nódulos enegrecidos delimitados na derme de coelhos, evidenciando calcificação tecidual.

Figura 8 Fotomicroscopia de pele de coelhos Nova Zelândia após inoculação de veneno de *L. laeta* e tratamento com a associação de células-tronco e dapsona, corada por hematoxilina e eosina (400x). Observa-se discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta) e discreta hiperqueratose ortoceratótica (canto superior direito).

Figura 9 Fotomicroscopia da pele de coelhos em que foram aplicados 20µg do veneno e tratados com PBS, após coloração com hematoxicilina e eosina (400x). A) Presença de crosta fibrinonecrótica (canto direito) e descontinuidade da epiderme. B) Presença de intenso infiltrado inflamatório neutrofílico (setas).

Figura 10 Identificação das fibras colagênicas em coelhos Nova Zelândia pela coloração tricrômico de Massom. A) Animal inoculado com veneno de *L. laeta* e tratado com PBS (CP), em que se observam feixes corados em azul que representam colágeno (20x). B) Animal inoculado com veneno de *L. laeta* e tratado com associação de dapsona e células-tronco mesenquimais (DAP+CTMs), em que se observam feixes de colágeno mais organizados e em maior quantidade (200x).

Figura 11 Identificação das fibras colágenas tipo I (vermelha) e tipo III (verde) pela técnica de Picro-sirius Red na pele de coelhos, 12 dias após inoculação experimental com veneno de *Loxosceles laeta*. A) Animal do grupo controle positivo, em que se nota predomínio absoluto de fibras colágenas marcadas em vermelho, que representam as fibras colágenas maduras, do tipo I (aumento de 400X). B) Animal do grupo tratado com a associação de dapsona e células-tronco mesenquimais, em que se observa uma organização maior das fibras colágenas e presença de fibras colágenas imaturas, do tipo III, marcadas por uma coloração esverdeada (aumento de 400X).

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1** Identificação das aranhas pertencentes ao gênero *Loxosceles* (aranha marrom) no Brasil, até Janeiro de 2013.
- Quadro 2** Principais grupos celulares e mediadores liberados durante a cicatrização tecidual.
- Quadro 3** Distribuição dos animais nos diferentes grupos e protocolos de tratamento após inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*.
- Tabela 1** Valores médios do número de eritrócitos ($X10^6/\mu\text{l}$) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.
- Tabela 2** Valores médios do volume globular (%) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.
- Tabela 3** Valores médios da concentração de hemoglobina (g/dL) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.
- Tabela 4** Valores médios do número de leucócitos totais (μl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.
- Tabela 5** Valores médios do número de neutrófilos, linfócitos e monócitos (μl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS

(CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 6 Valores médios do número de plaquetas ($X 10^3/\mu\text{l}$) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 7 Valores médios do tempo de protrombina (segundos) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 8 Valores médios do tempo de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (segundos) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 9 Valores médios da concentração de ureia sérica (mg/dl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 10 Valores médios da concentração de creatinina sérica (mg/dl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 11 Valores médios da concentração de creatina quinase sérica e sua fração MB (U/L) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*,

tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 12 Valores médios da concentração de aspartato aminotransferase (U/L) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 13 Valores médios de proteína total, albumina, alfa globulinas (1 e 2), beta globulinas (1 e 2) e gama globulinas de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tabela 14 Valores médios percentuais de contração de feridas cutâneas de coelhos após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta* tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de dapsona com células-tronco mesenquimais (Dap+CTMs).

Tabela 15 Médias das áreas ocupadas em *pixels* por colágeno em coelhos Nova Zelândia de acordo com os diferentes tipos de tratamentos instituídos após coloração com tricrômico de Masson em amostras coletadas 12 dias após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*.

Tabela 16 Médias de áreas ocupadas em *pixels* por colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) em coelhos Nova Zelândia de acordo com os diferentes tipos de tratamentos instituídos em amostras coletadas 12 dias após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*.

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos das células-tronco mesenquimais, isoladas e associadas à dapsona em feridas dermonecroticas em coelhos submetidos à inoculação de 20 µg de veneno de *Loxosceles laeta*. Foram utilizados 25 coelhos machos, adultos, Nova Zelândia, com peso médio de 1,0 kg, distribuídos em cinco grupos de cinco animais. À exceção do grupo controle negativo (CN), que foi submetido apenas à aplicação de água ultrapura, todos os outros grupos foram submetidos à aplicação de 20 µg de veneno de *Loxosceles laeta* na região interescapular e tratados 4 horas após a inoculação do veneno, da seguinte forma: grupo controle positivo (veneno + PBS); grupo DAP (veneno + 2 mg/kg de dapsona); grupo CTMs (veneno + células-tronco mesenquimais) e grupo DAP + CTMs (veneno + dapsona e células-tronco mesenquimais). Os animais foram avaliados diariamente e realizados registros fotográficos em altura pré-definida de 50 cm para posterior análise da evolução da área da ferida por morfometria. Amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da aplicação do veneno e 3, 6, 9 e 12 dias após, para avaliação e monitoração de parâmetros hematológicos e bioquímicos, incluindo proteinograma. Após 12 dias os animais foram eutanasiados e amostras de pele de (5 cm x 6 cm) ao redor da lesão foram retiradas e fixadas em paraformol para posterior análise histológica. No hemograma, houve leucocitose e discreta anemia ($p < 0,05$), três dias após a inoculação do veneno, nos grupos que receberam veneno, exceto no grupo DAP+CTMs em que a leucocitose não foi observada. No perfil proteico, observou-se aumento significativo de alfa-2 globulina ($p < 0,05$), 3 h após a inoculação do veneno, exceto no grupo que recebeu dapsona. Após a avaliação da taxa de contração das feridas, observou-se que as CTMs isoladas e associadas com dapsona, proporcionaram recuperação tecidual mais rápida, quando comparada aos outros tipos de tratamento. Em relação à histopatologia foi observado que os animais do grupo CP apresentaram extensas áreas de necrose, úlceras, intenso infiltrado neutrofílico e mineralização. Os animais tratados com dapsona, CTMs e associação entre as terapias apresentaram lesões menos significativas com áreas de mineralização e angiogênese. Além disso, observou-se maior deposição colagênica, principalmente devido ao colágeno do tipo III, no grupo DAP+CTMs, quando comparadas com o CN ($p < 0,05$). Conclui-se que a terapia com CTMs, principalmente quando associadas com a dapsona, devem ser consideradas como terapia futura para o loxoscelismo cutâneo.

Palavras-chave: araneísmo, feridas dermonecroticas, terapia regenerativa

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of mesenchymal stem cells (MSC), isolated and associated with dapsona in dermonecrotic wounds in rabbits inoculated with 20µg of *Loxosceles laeta* venom. 25 male adult rabbits, New Zealand, with an average weight of 1.0 kg were divided into five groups (n = 5). Except for the placebo group (PG), in which was only inoculated ultrapure water, in all other groups were applied 20µg of *Loxosceles laeta* venom in the interscapular region and treated four hours after with: phosphate buffer saline (PBS); dapsona (2mg/kg); MSCs (1,25X10⁶) and association of dapsona and MSCs. The animals were evaluated daily and photographic records made at pre-set 50 cm for further analysis of the evolution of the wound area by morphometry. Blood samples were collected immediately before the application of poison and 3, 6, 9 and 12 days for evaluation and monitoring of hematological and biochemical parameters, including protein concentrations. After 12 days the animals were euthanized and skin samples (5cmx6cm) around the lesion were removed and fixed in paraformol for subsequent histological analysis. In Blood cell count, mild anemia and leukocytosis was observed (p< 0.05) three days after inoculation of the poison, except in the group which we associated dapsona e MSC where leukocytosis was not observed. In protein profile, there was a significant increase in alpha- 2 globulin (p< 0.05), 3 hours after venom inoculation, except in the group receiving dapsona. After evaluating the rate of wound contraction, we observed that MSC isolated or in association with dapsona, showed faster tissue repair when compared to other types of treatment. Histologically it was observed that the animals that received PBS showed extensive areas of necrosis, ulcers, intense neutrophilic infiltrate and mineralization. Animals treated with dapsona, MSCs and with the association between the therapies had fewer significant lesions with areas of mineralization and angiogenesis. Moreover, we observed a higher collagen deposition, mainly due to collagen type III, in the group that received dapsona + MSCs when compared with PG (p < 0.05). We conclude that therapy with MSCs, particularly when associated with dapsona should be considered as a future therapy for cutaneous loxoscelism.

Keywords: araneism, dermonecrotic wounds, regenerative therapy

1. INTRODUÇÃO

Existem mais de 30 mil espécies de aranhas descritas no mundo, sendo a grande maioria peçonhenta. Dentre as espécies de interesse médico e médico veterinário a *Loxosceles* spp é responsável por 40% dos acidentes humanos no Brasil e apresenta veneno de elevada toxicidade (Andrade et al., 2000; Malaque et al., 2002). A síndrome clínica produzida pela picada dessa aranha é denominada de loxoscelismo, e pode desenvolver-se de duas formas distintas: cutânea, caracterizada por alterações clínicas locais, com uma ferida dermonecrótica de difícil cicatrização, e a forma cutâneo-visceral, em que são observadas alterações sistêmicas importantes como insuficiência renal aguda e distúrbios de coagulação sanguínea com risco de óbito (Sezerino et al., 1998; Silva et al., 2004; Tambourgi et al., 2010; Malaque et al., 2011).

As alterações cutâneas e viscerais observadas ocorrem devido a múltiplos fatores, envolvendo dano tecidual direto pelo veneno, injúria vascular secundária e liberação de enzimas pelos polimorfonucleares (Sezerino et al., 1998, Malaque et al., 2011). Apesar de o veneno da *Loxosceles* spp. ser uma mistura complexa de substâncias, sabe-se que a enzima com maior importância na dermonecrose é a fosfolipase D, que interage com a membrana celular desencadeando reações envolvendo o sistema complemento, plaquetas e leucócitos (Silva et al., 2004, Barbaro et al., 2005).

Não há tratamento específico com o soro antiloxoscélico, disponível na Medicina Veterinária (Melo et al, 2004; Collacio et al, 2008). O seu uso na medicina humana é discutível, dependente do protocolo de cada região. A terapia é baseada nos sinais clínicos observados, e, inclui a utilização de dapsona, ácido acetilsalicílico, antibióticos de amplo espectro e corticosteróides (Ministério da saúde, 2001; Silva et al., 2004; Peterson, 2006).

Como a infiltração neutrofílica é importante para o desenvolvimento da ferida dermonecrótica no loxoscelismo, a dapsona, que é um importante inibidor leucocitário, é sugerida como terapia potencial no tratamento (Phillips et al., 1995; Elston et al., 2005). Outros fármacos também já foram sugeridos, porém poucas evidências clínicas têm sido observadas a respeito da sua efetividade no auxílio da reparação tecidual (Phillips et al., 1995; Silva et al., 2004; Elston et al., 2005).

Portanto, a fim de melhorar a qualidade de vida do paciente, terapias mais inovadoras devem ser estudadas quanto ao real benefício na recuperação tecidual de lesões dermonecróticas extensas e de difícil cicatrização, como é observado no loxoscelismo. Sendo assim, a utilização de células-tronco é uma proposta, já que seu uso em terapias reparativas e regenerativas está emergindo na clínica médica e cirúrgica (Fortier, 2005).

As células-tronco podem ter origem embrionária, fetal ou de tecidos adultos. As células-tronco mesenquimais (CTMs), oriundas de tecido adulto como medula óssea e tecido adiposo estão sendo muito utilizadas em ensaios experimentais de regeneração tecidual devido ao potencial de diferenciação em diversos tecidos, seu fácil isolamento e expansão (Minguel et al., 2001; Bertassoli et al., 2013)

Até a presente data, nenhum estudo avaliou a utilização de células-tronco em feridas dermonecróticas ocasionadas pelo loxoscelismo. Assim o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos das células-tronco mesenquimais em feridas dermonecróticas após inoculação de veneno de *Loxosceles laeta*, por meio da monitorização da cicatrização tecidual, do perfil sanguíneo e de exames histológicos para avaliação de morfologia tecidual e quantificação de fibras colágenas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Loxosceles

2.1.1. Aspectos biológicos

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família *Sicariidae*, composta por dois gêneros e 122 espécies (Platnick, 2013). São popularmente conhecidas como “aranha marrom” por apresentarem coloração que varia do marrom claro ao marrom escuro. Variações nessa coloração podem auxiliar na identificação de algumas espécies como *L. laeta*, que possui uma mancha escura no cefalotórax. 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 sedentárias, de hábito noturno e pouco agressivas, portanto, a maioria dos acidentes ocorre quando acidentalmente comprimidas contra o corpo (Malaque et al., 2002).

Na natureza, essas aranhas podem viver por até sete anos e encontram-se sobre pedras, pilhas de tijolos, madeira, telhados, cascas de árvores, folhas caídas e cavernas (Gonçalves de Andrade et al., 2000; Tambourgi et al., 2010), porém habitam também locais intradomiciliares como móveis, porões e despensas (Machado et al., 2009). Podem resistir por meses sem água ou comida e algumas espécies como a *L. reclusa*, preferem presas mortas às vivas (Sandidge, 2003).

Encontram-se distribuídas por todo o mundo e são identificadas em ambientes com temperatura entre 8 e 43°C. Os acidentes ocasionados por sua picada já foram descritos na América, Europa, Ásia, África e Oceania (Silva et al., 2004; Silvestre et al., 2005). No Brasil, até o início do ano de 2013, já foram identificadas 12 espécies (Quadro 1), sendo pelo menos três de importância médica: *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (Gonçalves de Andrade et al., 2000; Ministério da saúde, 2001; Platnick, 2013).

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

Espécies de aranhas do gênero *Loxosceles* encontradas no Brasil

Loxosceles adelaida
Loxosceles amazonica
Loxosceles anomala
Loxosceles chapadensis
Loxosceles gaucho
Loxosceles hirsuta
Loxosceles imodesta
Loxosceles intermedia

Loxosceles laeta
Loxosceles niedeguidonae
Loxosceles puortoi
Loxosceles similis

Fonte: Adaptado de Platnick, 2013

Segundo dados epidemiológicos do Ministério da Saúde, há um aumento assustador nos acidentes por aranhas em humanos no Brasil. No ano de 2012 mais de 26.000 acidentes humanos foram notificados. Destes, mais de 90% estão concentrados nas regiões Sul e Sudeste. E apesar de serem consideradas pouco agressivas, sabe-se que as *Loxosceles* estão envolvidas em cerca de 40% dos acidentes humanos com aracnídeos no Brasil (Gonçalves de Andrade et al., 2000; Malaque et al., 2002; Kamimura et al., 2009). Os dados na medicina veterinária ainda são escassos, porém é observado que o número de casos animais vem acompanhando o aumento observado na medicina humana, principalmente pelo hábito intradomiciliar atual da maioria dos animais de estimação (Collacico et al., 2008; Machado et al., 2009).

2.1.2. Caracterização do veneno

O veneno das *Loxosceles* spp. apresenta numerosas enzimas, e algumas das proteínas que o compõem têm sido caracterizadas bioquímica e biologicamente quanto à estrutura e mecanismos de ação que acarretam os efeitos nocivos em mamíferos (Moura, 2005). Estudos revelaram presença de metaloproteases, fosfolipase-D, hialuronidase, serino-proteases, além de lipases, esterase, fosfatase alcalina e 5'-rinobonucleotideo-fosfohidrolase (da Silveira et al., 2002; Silva et al., 2004; Peterson, 2006).

O veneno da aranha *L. laeta* apresenta um perfil eletroforético bastante similar ao das espécies *L. intermedia* e *L. gaucho*. Esse perfil identifica cerca de 15 componentes, sendo os mais importantes as proteínas com massa molecular encontradas no intervalo de 30-40 kDa, constituídos principalmente pelas dermonecróticas, e as proteínas com alta massa molecular, no intervalo de 60-95 kDa, do qual fazem parte a serino-proteases (Barbaro et al., 1996). Dentre as enzimas dermonecróticas, destaca-se a esfingomielinase D (SMase D), uma enzima que catalisa a hidrólise da esfingomielinina,

resultando na formação de ceramida-fosfato e colina capazes de produzir lesões dermonecroticas, hemólise e agregação plaquetária (Andrade et al., 2005; Ferrara et al., 2009). Baseado na identidade sequencial na atividade bioquímica e no modelo molecular, Murakami et al. (2006) propuseram uma classificação das esfingomielinases D sequenciadas e isoladas, levando-se em consideração as particularidades das pontes dissulfeto. A classe 1, envolve as SMase 1 e a SMase 2 (Ferrara et al., 2009) obtidas da *L. laeta*. A classe 2 envolve as SMases D P1 e P2 da *L. intermedia*, Lr1 e Lr2 da *L. reclusa*.

Além das enzimas dermonecroticas, outro grupo de destaque são as proteases, consideradas como fatores hemorrágicos. Duas metaloproteinases, denominadas de Loxolisina A e Loxolisina B já foram identificadas no veneno de *L. intermedia*. A primeira apresenta atividade fibrinogenolítica, e a segunda atividade gelatinolítica e estão envolvidas nos distúrbios hemostáticos observadas no envenenamento por essa aranha (Feitosa et al., 1998).

A ação dessas enzimas são potencializadas pela ação da hialuronidase que degrada a matriz extracelular, principalmente por hidrolize do tecido conjuntivo e degradação do ácido hialurônico. Sendo assim, facilita a penetração desses componentes do veneno em vários compartimentos celulares e teciduais e contribui para o espalhamento gravitacional da lesão (Silva et al., 2004; Barbaro et al., 2005; da Silveira et al., 2007).

2.1.3. Sinais clínicos

A picada da aranha *Loxosceles* geralmente é indolor e ocasiona uma síndrome clínica definida como loxoscelismo que pode desenvolver-se de duas formas distintas; cutânea e cutânea-visceral (Tambourgi et al., 2010; Isbister e Fan, 2011). A apresentação cutânea ocorre em cerca de 80% dos acidentados e, na maior parte das vezes, é caracterizada por uma lesão dermonecrotica. Já a cutâneo-visceral ou sistêmica, a forma mais grave, acomete a minoria dos pacientes e pode levá-los ao óbito (Malaque et al., 2002; Silvestre et al., 2005). Ambas apresentam alterações clínicas semelhantes no local da picada (Isbister e White, 2004). Há diversos fatores que contribuem para a intensidade dos sinais clínicos após a picada da *Loxosceles* spp. Os fatores mais importantes envolvem a espécie da aranha e seu estágio de desenvolvimento, quantidade

de veneno inoculada, local da inoculação, assim como idade e características genéticas da vítima (Sezerino, et al., 1998; Gonçalves de Andrade et al., 1999; Barbaro, et al., 2005).

As alterações observadas após o acidente com as “aranhas marrom”, estão relacionadas ao dano tecidual direto pelo veneno, injúria vascular secundária pela formação de microtrombos e liberação de enzimas pelos polimorfonucleares (Sezerino et al., 1998, Malaque et al., 2011).

2.1.3.1 Sinais cutâneos

Os sinais cutâneos são observados na maioria dos casos de loxoscelismo, variando de pequenas áreas eritematosas a grandes áreas de ulceração e necrose (Tambourgi et al., 2010). Se os sinais clínicos de loxoscelismo cutâneo-visceral não forem observados dentro de 24 horas, tem-se o diagnóstico de loxoscelismo cutâneo (Silva et al., 2004).

Nas primeiras horas após o acidente, observam-se no local da picada dor, provavelmente devido à isquemia, prurido, edema, eritema, e áreas de hemorragia que precedem o local da necrose (Malaque et al., 2002; Silva et al., 2004; Tambourgi et al., 2010). Há um alastramento gravitacional da lesão, e evolução para uma lesão dermonecrótica que pode ocorrer até uma semana após a injúria. Na literatura humana é descrita como uma lesão em “placa marmórea”, por apresentar centro necrótico circundado por anel isquêmico esbranquiçado em um fundo eritematoso que ocorre cerca de 24 horas após a picada (Malaque et al., 2002). Essa descrição, no entanto, não é observada com frequência nos animais, já que dificilmente forma-se o anel esbranquiçado (Sezerino et al., 1998; Silva et al., 2004). A ferida evolui para uma úlcera geralmente dolorida e de difícil cicatrização (Isbister e White, 2004; Peterson, 2006).

O veneno da *Loxosceles* é uma mistura complexa de substâncias (Silva et al., 2004). Destas a enzima com maior importância na dermonecrose é a fosfolipase D, que interage com a membrana celular desencadeando reações envolvendo o sistema complemento, plaquetas e leucócitos (Silva et al., 2004, Barbaro et al., 2005; Isbister e Fan, 2011). Elston et al. (2000) sugerem que a trombose da microvasculatura, é o evento inicial para a formação da ferida. Por sua vez, a ação dos polimorfonucleares tem importância fundamental na inflamação e necrose observadas, uma vez que a depleção

de seus componentes em cobaias inibiu hemorragia, infiltração de leucócitos e reduziu acentuadamente o edema no local de inoculação do veneno de *Loxosceles* (Smith e Micks, 1970). No entanto, sabe-se que a ação dos polimorfonucleares não é induzida diretamente pelo veneno e sim por outros fatores intrínsecos do organismo (Patel et al., 1994). Os estudos de ativação celular pelo veneno loxoscélico sugerem que muitos mediadores pró-inflamatórios solúveis tem papel importante no desenvolvimento da lesão. Observou-se ativação de célula endotelial pelo veneno, com estímulos à liberação de mediadores (IL-8) capazes de atrair polimorfonucleares (Patel et al., 1994) e alterações em culturas primárias de queratinócitos com produção de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-8), que são importantes agentes citotóxicos (Malaque et al., 1999).

2.1.3.2. Sinais sistêmicos

O loxoscelismo cutâneo visceral é menos comum (aproximadamente 15% dos casos), porém, além da lesão dermonecrótica, observam-se alterações que podem levar o paciente a óbito (Sezerino et al., 1998; Malaque et al., 2002; Malaque et al., 2011).

As alterações clínicas e laboratoriais mais comuns incluem choque, icterícia, hemólise intravascular associada à hematúria e hemoglobinúria, trombocitopenia, leucocitose e insuficiência renal aguda (Hogan et al., 2004). As reações hemolíticas são bem observadas em eritrócitos de humanos, suínos e ratos, porém em coelhos, e “porquinhos da índia” aparentemente nenhuma reação hemolítica ocorre, indicando variação entre espécies na susceptibilidade aos efeitos sistêmicos do veneno (Silva et al., 2003).

A coagulação intravascular disseminada (CID) é um evento incomum, e sua patogenia ainda não foi bem esclarecida (Tavares et al., 2004). O veneno da *Loxosceles* spp é capaz de promover agregação plaquetária e trombocitopenia horas após o envenenamento, devido ao consumo intenso de plaquetas no local da ferida, assim como uma possível ação direta e transitória do veneno na medula óssea (Silva et al., 2003; Tavares et al., 2004; Pauli et al., 2009).

A observação do número de leucócitos na circulação sanguínea é variável e dependente do tempo de coleta após o envenenamento, assim como da dose do veneno aplicada (Silva et al., 2003; Mcglasson, et al., 2007, Malaque et al., 2011). Silva et al. (2003) verificaram leucopenia mais intensa em coelhos, 24 horas após a inoculação do

veneno de *L. intermedia*, com posterior recuperação cinco dias após o envenenamento. Verificou-se que a leucopenia está relacionada á neutropenia observadas no mesmo período. Esse fato ocorre pela migração massiva de neutrófilos para o tecido, horas após o acidente, ocasionando em um decréscimo transitório de leucócitos na circulação sanguínea. Mcglasson et al. (2007), observaram resultados semelhantes 24 horas após a inoculação de 4 e 10 µg de *L. reclusa* em coelhos. Porém, verificou-se leucocitose intensa e estatisticamente significativa 72 horas após a inoculação.

Já foram detectados antígenos de *L. intermedia* nos rins (Luciano et al., 2004; Chaim et al., 2006), coração (Lopes et al., 2010), pulmão e fígado (Christoff et al., 2008) de camundongos envenenados experimentalmente .

A insuficiência renal aguda é a causa mais frequente de óbito no loxoscelismo, associada à injúria renal direta, bem como depósito de hemoglobina nos túbulos renais advindos da intensa hemólise intravascular (Malaque et al., 2002; Tambourgi et al., 2010; Malaque et al., 2011). Os efeitos nefrotóxicos do veneno são demonstrados com base nas alterações laboratoriais de pacientes acometidos e geralmente inclui aumento de ureia e creatinina, proteinúria, hematúria e hemoglobinúria. Foi demonstrado por Luciano et al. (2004), uma ligação direta do veneno de *L. intermedia* nas estruturas renais de camundongos, sugerindo que esse veneno atua como um potente agente nefrotóxico. Segundo Chaim et al. (2006) a ação direta do veneno ocasiona em edema glomerular e nefrose tubular, sendo um dos mecanismos da insuficiência renal aguda.

Além da ligação direta do veneno no coração e no fígado, observou-se aumento de CK e CK-MB, 4 horas após a inoculação de veneno de *L. intermedia* em camundongos (Lopes et al., 2010) e das enzimas hepáticas 6 horas após a inoculação (Christoff et al., 2008) sugerindo ação tóxica do veneno nesses tecidos. Além disso, a formação de trombos pode diminuir a circulação sanguínea para órgãos importantes, ocasionando em perda de função e em sinais clínicos associados (Tavares et al., 2004).

2.1.3.3. Alterações histopatológicas

A picada da aranha *Loxosceles* spp, geralmente resulta em feridas dermonecróticas extensas e de difícil cicatrização (Elston et al., 2000). Porém a maioria dos estudos relacionados ao loxoscelismo não focam nas alterações histopatológicas. Os achados histopatológicos mais importantes dependem do tempo de coleta do material

após inoculação do veneno. Mas no geral observa-se edema, trombose e áreas hemorrágicas iniciais, seguidos por infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico e necrose de coagulação na epiderme e derme (Elston et al., 2000; Silva et al., 2004), associado a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e MCP-1 em patas de camundongos como constatado por Barbaro et al. (2010). A infiltração neutrofílica massiva é considerada a principal responsável pelo desenvolvimento da ferida dermonecrotica, assim como demonstram diversos estudos experimentais.

Ospedal et al. (2002) avaliaram amostras histopatológicas sequenciais quatro e 12 horas e um, dois e cinco dias após a inoculação de 40µg de veneno de *L.intermedia* em coelhos. Este estudo demonstrou que em quatro horas após a inoculação do veneno, já se observava intenso infiltrado neutrofílico, associado à trombose, hemorragia e edema. Esse infiltrado tornou-se mais intenso aos cinco dias, e houve progressão para necrose da epiderme associado à mionecrose e necrose de coagulação. Destruição da epiderme, hemorragia massiva e necrose epidérmica também foram descritas por Sunderkotter et al. (2001) em camundongos.

Elston et al. (2000) avaliaram amostras histopatológicas 14 dias após a inoculação de 20 µg de *Loxosceles* em 40 coelhos Nova Zelândia. Observou-se em todos os animais necrose de coagulação na epiderme e derme assim como um denso infiltrado inflamatório composto predominantemente por neutrófilos. Nesse estudo o tratamento com dapsona não alterou os achados histopatológicos.

2.2. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A cicatrização tecidual é um processo altamente coordenado, dinâmico, intercedido e sustentado por grupos celulares, mediadores bioquímicos e hemodinâmicos a fim de garantir a restauração morfofuncional do tecido lesionado (Singer e Clark, 1999; Barrientos et al., 2008). Os eventos que ocorrem podem ser divididos didaticamente em fases que envolvem hemostasia, eventos inflamatórios, proliferação celular, deposição de matriz e remodelamento tecidual (Frank et al., 1996; Hosgood, 2006). Porém esses processos não são estáticos, ocorrem de forma contínua e em interação e envolvem diversos tipos celulares, incluindo queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, neutrófilos, macrófagos e plaquetas (Hosgood, 2003; Barrientos et al., 2008). Cada uma dessas fases é regulada por diversos fatores

quimiotáticos e fatores de crescimento que além da função de quimiotaxia, induzem a proliferação e ativação celular (Quadro 2) (Hosgood, 2006).

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

2.2.1. Fase de hemostasia

A primeira da fase da cicatrização de feridas é a hemostasia que ocorre imediatamente após a injúria tecidual. A ferida formada é preenchida por sangue e linfa dos vasos sanguíneos e linfáticos rompidos, porém rapidamente, compostos vasoativos como catecolaminas e histaminas são liberados e induzem uma vasoconstrição transitória que perdura por cerca de 10 minutos, minimizando a perda sanguínea (Balbino et al., 2005; Reinke e Sorg, 2012). Logo após, ocorre vasodilatação, permitindo o influxo de fluídos, células sanguíneas e plaquetas para o espaço extravascular, o que ativa a cascata de coagulação e ocasiona na formação do coágulo sanguíneo. Esta estrutura atua coaptando as bordas das feridas, limita a perda de sangue e fluídos e forma uma barreira imediata contra agentes exógenos. Além disso, em seu interior, ocorre a formação de uma matriz extracelular provisória (MEP), formada por dímeros de fibronectina associados à fibrina, que possui vários sítios para adesão celular, principalmente de neutrófilos, macrófagos e células do tecido conjuntivo (Hosgood, 2006; Barrientos et al., 2008). Diversos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos são produzidos durante a coagulação, e recrutam os leucócitos para o sítio da lesão.

2.2.2. Fase inflamatória e desbridamento

A fase inflamatória é considerada a fase de preparo do leito da ferida para o início da cicatrização, caracterizada essencialmente pela migração de leucócitos para o leito da ferida (Hosgood, 2003). Os mediadores inflamatórios produzidos pela MEP, como os fibrinopeptídeos, produzidos pela conversão de fibrinogênio em fibrina, são potentes quimiotáticos para os neutrófilos (Hosgood, 2006). A atração adicional dos neutrófilos é potencializada pelas proteinases liberadas pelos próprios neutrófilos à medida que degradam o tecido necrótico desnaturado. Essas são as primeiras células a predominar na lesão e tem funções importantes como fagocitose de bactérias e de debris celulares, removendo-os do sítio lesional (Balbino et al., 2005). Além disso, a liberação de radicais superóxidos pelos neutrófilos acarreta a morte local das bactérias, degradação da matriz extracelular desnaturada assim como células danificadas, contribuindo para a formação do exsudato no leito da ferida (Hosgood, 2003). Devido à

liberação de substâncias quimioatraentes específicas como fragmentos da matriz extracelular e fator beta transformador do crescimento, monócitos se infiltram no local da lesão e se transformam em macrófagos ativos. Os macrófagos por sua vez modulam a produção e destruição da MEP, removem debris celulares e induzem apoptose celular além de liberarem muitas citocinas que atraem fibroblastos para o leito da ferida, iniciando-se a formação de tecido de granulação (Singer e Clark, 1999; Guo e DiPietro, 2010, Koh e DiPietro, 2011). Durante a fase inflamatória a força biomecânica da ferida ainda é pequena, sendo sustentada pela fibrina presente no coágulo sanguíneo (Hosgood, 2003).

2.2.3. Fase proliferativa

A transição da fase inflamatória para a proliferativa é assinalada pela invasão de fibroblastos e por um acúmulo ainda maior de colágeno na ferida (Hosgood, 2006). Essa fase é marcada por intensa angiogênese, fibroplasia e epitelização, ocasionando na substituição da MEP pelo tecido de granulação e conseqüentemente em um ganho de força da ferida (Reinke e Sorg, 2012).

A angiogênese ocorre inicialmente 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 a suprimento de oxigênio e nutrientes do tecido de granulação formado (Singer e Clark, 1999; Hosgood, 2003). A neovascularização é um processo complexo, dependente da interação da MEP com mediadores que estimulam a migração e proliferação de células endoteliais (Singer e Clark, 1999). Esse evento é modulado, sobretudo, pelo fator de crescimento endotelial vascular- A (VEGF-A) produzido pelas células endoteliais, macrófagos e células epidérmicas ativas (Hosgood, 2003).

A fibroplasia é caracterizada pela migração e ativação de fibroblastos na ferida em decorrência da liberação de citocinas como $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TGF-}\beta$, 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). O novo tecido começa a invadir o espaço aproximadamente quatro dias após a lesão (Hosgood, 2003).

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 as 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).

Há diversos estímulos para a migração e proliferação epitelial, incluindo EGF, TGF α , e KGF, produzidos pelas próprias células epiteliais, fibroblastos e macrófagos. À medida que ocorre a reepitelização, há um acúmulo progressivo de novo material da membrana basal sob as células em migração, a partir da margem da ferida para dentro da mesma (Hosgood, 2003).

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 e associados às ligações cruzadas de colágeno colaboram com a contração da ferida que ocorre até que as suas margens se encontrem (Guo e DiPietro, 2010).

2.2.4. Fase de maturação e remodelamento

A fase de remodelamento é considerada a última fase da cicatrização cutânea e pode durar por até um ano (Reinke e Sorg, 2012). A transição do tecido de granulação para a cicatriz requer o remodelamento e maturação do conteúdo de tecido conjuntivo da ferida. Para tanto é necessário uma modulação na produção/degradação de colágeno e sua maturação. Enzimas proteolíticas denominadas de metaloproteinases da matriz (MMP), secretadas por macrófagos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos,

controlam a velocidade de degradação do colágeno na ferida (Hosgood, 2003). O colágeno do tipo III é substituído pelo colágeno do tipo I de forma gradativa, que é mais espesso que o primeiro e os processos de angiogenese assim como o fluxo sanguíneo diminuem, ocasionando na diminuição da atividade metabólica local (Reinke e Sorg, 2012).

2.3. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DO LOXOSCELISMO

Há ainda muita contradição em relação à melhor terapia para o tratamento das feridas dermonecróticas advindas do loxoscelismo. Diversas terapias já foram avaliadas em estudos experimentais, porém os dados são divergentes e poucas conclusões podem ser feitas quanto à melhor terapia, principalmente para a melhor resolução da ferida dermonecrótica (Maynor et al., 1997; Hogan et al., 2004; Swanson e Vetter, 2006). As terapias reportadas 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) e dapsona (Rees et al., 1985; Barret et al., 1994; Phillips et al., 1995; Elston et al., 2005).

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. No entanto, há poucas evidências científicas que corroborem a sua eficácia, e os dados são contraditórios (Phillips et al., 1995; Maynor et al., 1997; Hogan et al., 2004).

A intervenção cirúrgica imediata não é recomendada, já que pode aumentar a inflamação local e assim exacerbar os efeitos do veneno, prolongando a injúria tecidual e aumentando a extensão da ferida (Silva et al., 2004; Pauli et al., 2006). A remoção da escara necrótica pode ser apropriada quando as lesões apresentam complicações e com dificuldade de cicatrização e somente quando estiverem estáveis, por volta de seis a oito semanas pós-injúria (Sams et al., 2001; Wendell, 2003). Nesses casos, geralmente é necessário uma cirurgia plástica reconstrutiva posterior (Hogan et al., 2004).

Os corticosteroides fazem parte do protocolo de tratamento do loxoscelismo humano no Brasil (Ministério da Saúde, 2001). Não há dados suficientes que sustentam a sua utilização para o tratamento do loxoscelismo cutâneo, já que mesmo quando fornecidos de forma precoce, não previnem o desenvolvimento e progressão da ferida dermonecrótica (Rees et al., 1985; Hogan et al., 2004; Pauli et al., 2006). Porém eles provavelmente tem uma ação benéfica, nos casos sistêmicos em decorrência do seu mecanismo imunossupressor e devido à ação protetora da membrana das hemácias, diminuindo a hemólise intensa que ocorre nessa síndrome (Sams et al., 2001; Peterson, 2006).

O soro antiloxoscélico é o único tratamento específico para neutralizar a ação do veneno. Segundo o Ministério da Saúde (2001), a sua utilização varia de 12 a 70% de acordo com a região do Brasil analisada. Apesar do uso disseminado do soro, as opiniões são divergentes quanto a eficácia do soro antiloxoscélico em neutralizar os efeitos locais do veneno (Pauli et al., 2009). Na rotina clínica isso geralmente ocorre pelo fato da maioria dos casos se apresentar após 4 horas do acidente, e a partir desse momento o soro antiloxoscélico pode não ser mais eficaz (Sezerino et al., 1998; Isbister e White, 2004).

2.3.1. Dapsona

A dapsona (4,4'-Diaminodiphenilsulfona) é uma droga utilizada há muito tempo para o tratamento de hanseníase e atualmente é recomendada para o tratamento de inúmeras doenças inflamatórias não infecciosas, como a dermatite herpetiforme (Wolf et al., 2000). É absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal e atinge altas concentrações séricas em 2 a 8 horas após a administração oral. A sua meia-vida é em torno de 20 a 30 horas (Wolf et al., 2000). Devido à ação de inibir a degranulação polimorfonuclear e conseqüentemente reduzir a inflamação local e a destruição ocasionadas por essas células, a dapsona está sendo amplamente estudada em relação às feridas dermonecróticas ocasionadas pelo loxoscelismo (Barret et al., 1994; Phillips et al., 1995; Hogan et al., 2004; Elston et al., 2005). Além disso, foi demonstrado que a dapsona inibe a diapedese, pois suprime a função da integrina leucocitária, diminuindo a adesão de neutrófilos no endotélio vascular e conseqüentemente o seu deslocamento para o espaço extravascular (Booth et al., 1992).

A dapsona pode ser responsável por uma variedade de efeitos colaterais, alguns dos quais podem se confundir com a evolução do loxoscelismo sistêmico, como anemia hemolítica e trombocitopenia (Sams et al., 2001). Além desses sinais, podem-se observar com frequência, metahemoglobinemia, leucopenia, e mais raramente neuropatia periférica (Coleman, 1995; Bryant e Pittman, 2003; Hogan et al., 2004; Andersen et al., 2011). Múltiplos estudos em diferentes modelos animais foram realizados comparando o uso dapsona, e, no entanto mostram resultados contraditórios.

Barret et al (1994), verificaram efeito positivo no uso da dapsona, após inoculação de 30 µg do veneno de *L. reclusa* em cobaias, quando comparada a um grupo sem tratamento, e outro utilizando-se choque elétrico. Eles verificaram que os animais tratados com dapsona, tiveram menor área de ferida necrótica após três dias da inoculação do veneno.

Phillips et al. (1995), fizeram um estudo randomizado com coelhos Nova Zelândia, utilizando dapsona, terapia com oxigênio hiperbárico e ciproheptadine. Iniciaram o tratamento quatro horas após a inoculação de 20 µg de veneno de *L. deserta*, e os animais foram acompanhados por 10 dias. Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi observada, tanto em relação ao tamanho da lesão, como nas alterações histopatológicas.

Assim como no estudo acima, Dewey et al. (2005) não observaram efeito positivo na evolução do tamanho da ferida, quando utilizados dapsona, colchicina, triancinolona e difenidramina, em coelhos, após inoculação de 20 µg do veneno de *L. reclusa*.

2.4. TERAPIA CELULAR

As células-tronco são genericamente definidas como células indiferenciadas capazes de se multiplicar e se diferenciar em tecidos específicos (Fortier, 2005). 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. São de origem embrionária ou obtidas de tecidos de indivíduos

adultos, como as células-tronco mesenquimais (CTMs) que podem ser extraídas da medula óssea, tecido adiposo, placenta, pulpa dentária e membranas fetais (Miura et al., 2003; Caplan, 2007; Del Carlo et al., 2009; Barreto Filho e Oliveira, 2012). As CTMs obtidas do tecido adiposo possuem os mesmo genes e o mesmo potencial de diferenciação, quando comparadas às CTMs extraídas de outros locais (Lin et al., 2008). Além disso, o uso dessas células está se tornando cada vez mais atraente devido ao fácil isolamento, rápida expansão *in vitro*, e a possibilidade de coletar grande quantidade de tecido de uma só vez (Bertassoli et al., 2013).

Com o intuito de caracterizar e padronizar a população celular, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (SITC) definiu critérios mínimos para a classificação das CTMs: a) a propriedade de aderir ao plástico quando mantidas em garrafas de cultura; b) multipotência *in vitro* o que reflete a capacidade de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos em condições adequadas; c) ter um padrão de expressão de marcadores de superfície celular de CD105, CD73 e CD90 para mais de 95% da população celular e d) expressão menor que 2% ou ausência de expressão dos marcadores de superfície celular CD45, CD34, CD14, CD11b CD79a, CD19 e HLA-DR classe II .

As CTMs apresentam alta plasticidade, e tem a capacidade de se diferenciar em diversas células distintas, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, células epidérmicas (Minguel et al., 2001; Xiaobing et al., 2006). Podem ser transplantadas para sítios lesionais logo após lesão tecidual ainda indiferenciadas, ou após a indução, expansão e diferenciação em tecidos específicos (Caplan, 2007; Del Carlo, 2009).

No geral, há quatro maneiras da utilização de CTMs, sendo elas 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 (Cha e Falanga, 2007).

O seu potencial de diferenciação em diversos tecidos, o alto potencial em se expandir *in vitro* assim como fácil isolamento e cultura, fazem dessas células uma importante ferramenta nas terapias regenerativas (Minguel et al., 2001). Além da capacidade de diferenciação, as CTMs secretam um largo espectro de moléculas bioativas como citocinas e fatores de crescimento que podem promover um

microambiente de regeneração para uma variedade de injúrias (Caplan, 2007; Harman, 2013). Os mecanismos moleculares envolvidos nas propriedades imunomodulatórias das CTM ainda não foram completamente elucidados, porém sabe-se que essas células produzem uma grande quantidade de fatores solúveis que interferem no comportamento das células inflamatórias e modulam a função imunológica de várias populações celulares do sistema imune, tais como células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e B e células NK (Nauta e Fibbe, 2007; Zhao et al., 2010, Kim et al., 2013). Um dos principais fatores produzidos pelas CTMs é a indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), que provavelmente contribui para a redução da fase inflamatória durante a reepitelização (Neto et al., 2012).

A perspectiva de utilização de CTM no tratamento de feridas cutâneas é promissora, uma vez que ensaios experimentais mostram que essas células tem capacidade de acelerar o processo de cicatrização tecidual por diferenciação em alguns tipos celulares importantes para a cicatrização, e por efeito parácrino, estimulando a proliferação fibroblástica, promovendo angiogênese e conseqüentemente aumentando a velocidade de cicatrização das feridas (Hocking e Gibran, 2010; Kim et al., 2013). A maioria dos trabalhos sugere que a contribuição do efeito da diferenciação celular para a cicatrização tecidual é limitada, visto à pouca adesão e sobrevivência das CTMs no local da injúria (Hocking e Gibran, 2010). Devido a essas limitações, tem-se demonstrado que o efeito parácrino das células-tronco mesenquimais é o principal mecanismo observado nos efeitos benéficos das CTMs nas respostas às injúrias (Lau et al., 2009).

Kim et al. (2013) avaliaram o efeito do implante local de células-tronco mesenquimais autólogas oriundas da medula óssea, em cães da raça Beagle após realização de feridas cutâneas experimentais. Observaram que o grupo tratado com CTMs apresentou uma cicatrização mais rápida, devido ao estímulo à reepitelização, estímulo à proliferação fibroblástica, o que resulta em aumento da deposição colagênica, assim como estímulo para neovascularização, em comparação com as feridas não tratadas. Verificaram ainda a diminuição de expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-2 e INF- γ) nos animais tratados com células-tronco, corroborando que as CTMs contribuem para modulação da inflamação local.

Neto et al. (2012) observaram que a aplicação local de CTMs autólogas, extraídas da medula óssea, acelerou a reepitelização das lesões cutâneas realizadas experimentalmente em camundongos diabéticos, quando comparada a limpeza diária com solução salina e com oclusão com membrana semipermeável. Segundo os autores, o estímulo positivo na reepitelização pôde ser atribuído às características imunomodulatórias das CTMs assim como sua plasticidade e possibilidade de transdiferenciação celular.

Em um estudo clínico controlado e randomizado, Martins et al. (2011) avaliaram como satisfatório o uso das CTMs autólogas oriundas de tecido adiposo na cicatrização de feridas após abdominoplastia em humanos. O implante dessas células resultou em efeito positivo na cicatrização das feridas, principalmente levando-se em consideração as avaliações realizadas pelos médicos e pacientes que receberam a aplicação.

Em relação à transdiferenciação celular, Sasaki et al. (2008) demonstraram a capacidade de diferenciação das CTMs oriundas da medula óssea de camungos *in vitro* em queratinócitos e células endoteliais. Foi constatado também por Xiaobing et al. (2006), que o implante local imediato de CTMs após feridas profundas produzidas experimentalmente por queimaduras em suínos, após sua diferenciação em células epidérmicas e endoteliais, aumentou a qualidade e velocidade da cicatrização das feridas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido atendendo aos princípios éticos respeitando o bem estar animal e minimizando o desconforto. Foi aprovado de acordo com o protocolo nº83/2013 (anexo 1) do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.1. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 25 machos, adultos, Nova Zelândia, com aproximadamente 1kg, adquiridos da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa da EV-UFMG, no município de Igarapé. A escolha de coelhos para o experimento foi baseada em estudos anteriores que apontam essa espécie como o melhor modelo experimental para simular

lesão dermonecrótica semelhante à que ocorre no loxoscelismo humano (Silva et al., 2004; Elston et al., 2005).

Os animais foram mantidos durante todo experimento no Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal (LAMACA) da EV/UFMG e acondicionados em gaiolas metálicas individuais de dimensões de aproximadamente 75 cm de comprimento por 30 cm de largura recebendo água e ração comercial *ad libitum*.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após período de adaptação de cinco dias, os animais foram randomicamente distribuídos em cinco grupos de cinco animais: controle negativo (CN), controle positivo (CP), dapsona (DAP), células-tronco mesenquimais (CTMs) e dapsona + células-tronco (DAP+CTMs). O grupo CN recebeu somente inóculo de água ultrapura. Todos os outros grupos foram inoculados com 20 µg de veneno de *L. laeta*, diluídos em 0,2 ml de PBS e tratados com PBS (CP), dapsona (DAP), células-tronco (CTMs) e associação de dapsona e células-tronco (DAP+CTMs), conforme quadro abaixo (Quadro 3). No intuito de simular um reconhecimento precoce da lesão assim como maximizar o efeito das terapias instituídas, todos os tratamentos iniciaram quatro horas após a inoculação do veneno conforme Philips et al (1995).

Quadro 3 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos e protocolos de tratamento após inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*.

Grupo	Denominação	Número de animais	Descrição
CN	Controle negativo	Cinco	Inoculação intradérmica de 0,2ml de água ultrapura.
CP	Controle positivo	Cinco	Após inoculação de 20µg de veneno de <i>L.laeta</i> , os animais foram tratados com 500µl de PBS por via intradérmica em quatro pontos equidistantes do local da lesão formada.
DAP	Dapsona 2mg/kg	Cinco	Após inoculação de 20µg de veneno de <i>L.laeta</i> , os animais foram tratados com 2mg/kg via sonda nasoesofágica da droga, diluída em quatro partes de álcool absoluto e seis partes de água a cada 24 horas por quatro dias seguidos.
CTMs	Células-tronco mesenquimais	Cinco	Após inoculação de 20µg de veneno de <i>L.laeta</i> , os animais foram tratados com 1,25X10 ⁶ CTMs diluídas em 500µl de PBS por via intradérmica, em quatro pontos equidistantes ao redor da lesão formada, totalizando 5X10 ⁶ CTMs por coelho.
DAP+CTMs	Dapsona 2mg/kg + células-tronco mesenquimais	Cinco	Associação do tratamento dos grupos CTMs e DAP

* todos os tratamentos iniciaram-se quatro horas após a inoculação do veneno

3.3. INOCULAÇÃO DO VENENO

Para a aplicação do veneno não foi utilizado nenhum método de contenção química, sendo realizada somente a contenção manual. Utilizou-se 20 µg do veneno de *L. laeta* diluídos em 0,2 ml de PBS para aplicação ID na região interescapular com o auxílio de uma seringa de insulina (100 u.i) após tricotomia e antissepsia com clorexidine 0,5%. (Figura 1). Imediatamente após a aplicação observou-se a formação de uma vesícula temporária, comprovando o local correto de aplicação na derme.

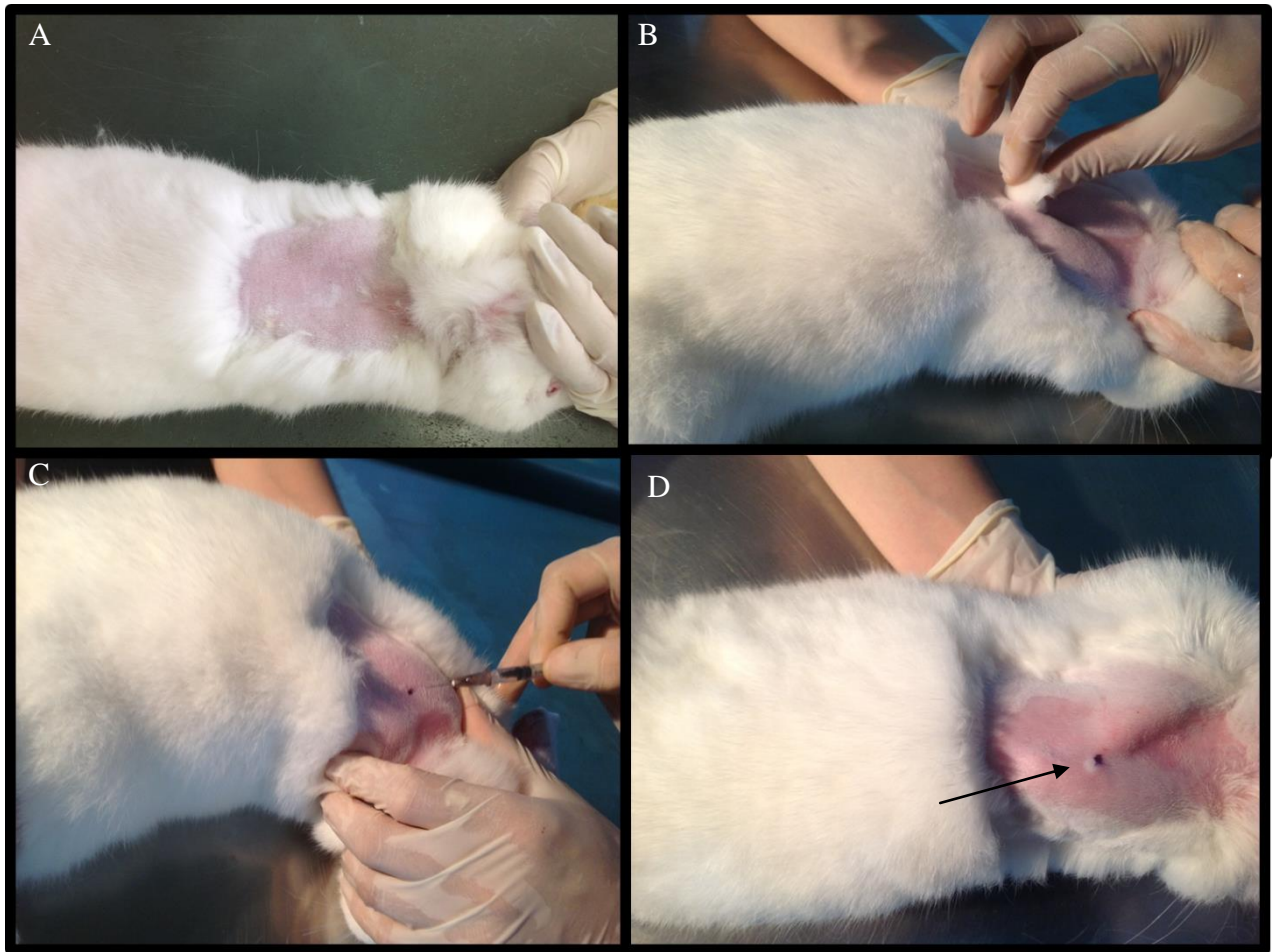


Figura 1- Sequência de procedimentos realizados na região interescapular de todos os coelhos da raça Nova Zelândia para aplicação do veneno de *Loxosceles laeta*. A) Foto demonstrando o momento imediatamente posterior à tricotomia da região interescapular; B) Antissepsia com clorexidine 0,5%, imediatamente antes da aplicação do veneno; C) Aplicação de 0,2 ml de uma solução contendo 20 µg de veneno de *L.laeta* com seringa de insulina (100u.i) por via intradérmica; D) Aspecto da pele logo após a injeção do veneno (seta), em que se nota a formação de uma vesícula temporária, confirmando a aplicação intradérmica do veneno.

3.4. TRATAMENTO

O protocolo de tratamento dos animais consistiu na administração de 2mg/kg de dapsona por via sonda nasoesofágica a cada 24 horas por quatro dias consecutivos, $1,25 \times 10^6$ CTMs diluídas em 500µl de PBS em quatro pontos equidistantes do local da lesão formada, e volume equivalente de PBS também por via intradérmica em quatro pontos equidistantes conforme disposição dos grupos, demonstrado no Quadro 3.

Foi utilizada a dapsona liofilizada, bruta. Antes da aplicação, esta foi diluída em álcool etílico absoluto e água ultrapura (4:6), para evitar precipitação.

3.5. EXTRAÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Para obtenção das CTMs foi utilizado tecido adiposo da região interescapular de dois coelhos Nova Zelândia doadores. A extração desse material foi feita no bloco cirúrgico do Hospital Veterinário da UFMG (Figura 2), sob anestesia geral com propofol (6mg/kg). Após a extração, os coelhos foram eutanasiados com sobredose do fármaco supracitado. O tecido adiposo coletado foi lavado com PBS e colocado em um tubo falcon 50ml com 20ml de colagenase durante 1 hora, submetendo o material à agitação a cada 15 minutos para digestão enzimática. Após esse período, adicionou-se 20ml de soro fetal bovino para inibir a atividade da colagenase e assim evitar danos às células se submetidas á longa exposição com essa enzima. A amostra foi então centrifugada a 23°C e 1.200rpm por 10 minutos. Após a centrifugação obteve-se três frações. A parte depositada no fundo (“pellet”), que representa a parte celular foi ressuspensa em meio Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino, penicilina G, estreptomicina e anfotericina (PSA) e plaqueadas em frascos de cultura celular de 75cm² de área de superfície (garrafas T75) contendo o meio DMEM suplementado. As culturas celulares foram mantidas em atmosfera umidificada dentro de estufa a 37°C com 5% CO₂ até confluência de aproximadamente 90%. Após essa meta, a cultura primária passou pelo processo de tripsinização para que as células aderentes fossem desprendidas e o primeiro repique fosse feito. Dessa forma as células ressuspensas foram transferidas para outras 3-5 garrafas (1ª passagem), utilizando-se 0,5ml tripsina-EDTA a 0,25%. O mesmo procedimento foi realizado sempre quando a confluência de 90% era atingida, de modo que a cada passagem a população de CTMs foi se tornando mais homogênea e pura. O isolamento da população de CTMs baseou-se na habilidade destas em aderirem ao plástico do frasco de cultura celular. Entre a 3ª e 5ª passagem as células-tronco foram caracterizadas fenotipicamente por meio de indução de diferenciação em células adipogênicas e osteogênicas.

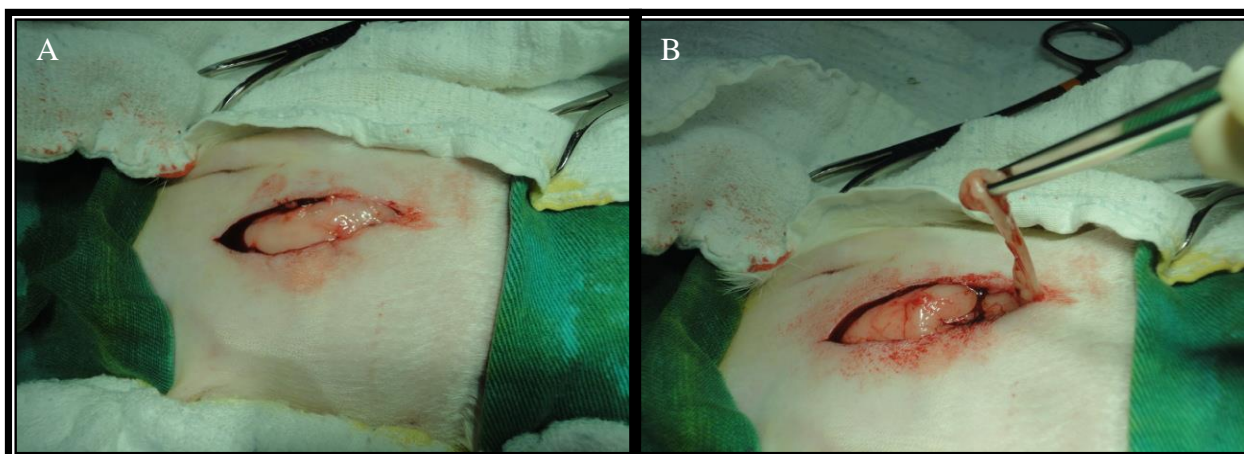


Figura 2- Retirada de tecido adiposo da região interescapular em coelhos Nova Zelândia para posterior isolamento das células-tronco mesenquimais. A) Exposição do tecido adiposo após incisão de pele. B) Retirada do tecido adiposo para posterior isolamento das células-tronco mesenquimais.

3.5.1. Tripsinização das células-tronco mesenquimais

A tripsinização é um procedimento necessário para o desprendimento das células aderidas no plástico, para que elas possam ser expandidas e transferidas para outras garrafas T75. Foi realizado após a retirada de todo o meio de cultura da garrafa e da lavagem cuidadosa das células aderidas com 10ml de PBS por duas vezes.

Após a retirada do PBS, 1ml de tripsina/EDTA foi adicionada à garrafa de cultura, e inativada cinco minutos após com adição de 5ml de meio DMEM com soro fetal bovino 10%. Após, realizou-se a centrifugação por 10 minutos à 1200rpm. O “pellet” obtido foi ressuspensionado em meio DMEM com soro fetal bovino e assim distribuído para outras três a cinco garrafas.

3.5.2. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células-tronco cultivadas foi avaliada pelo ensaio de metabolização 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Trata-se de um método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o MTT, em cristais de formazan, que são insolúveis em água.

Foram plaqueadas 5×10^4 células-tronco/poço em placas de 24 poços. Posteriormente, o cultivo celular foi incubado com o 170 μ l de MTT (5mg/ml; Sigma-Aldrich, USA) em atmosfera e temperaturas controladas (5% de CO₂, 37°C) por duas

horas. Os cristais de formazan gerados foram observados em microscópio de luz invertida. Após a visibilização, esses cristais foram solubilizados com a adição de SDS 10%-HCl, para quantificação por densidade óptica a 595nm, em leitor automático de microplacas

3.5.3. Ensaio de diferenciação *in vitro* das CTMs

As CTMs foram induzidas à diferenciação adipogênica e osteogênica confirmando a sua característica de pluripotencia. Para cada caracterização foram utilizadas CTMs indiferenciadas, cultivadas de forma usual, e utilizadas como controle dos ensaios de diferenciação (Figura 3a).

Para a diferenciação adipogênica, fez-se o plaqueamento de 5×10^4 células/poço em placas de seis poços e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB, acrescido de dexametasona ($0,5 \mu\text{M}$), insulina ($1 \mu\text{M}$), indometacina ($60 \mu\text{M}$) e isobutilmetilxantina ($0,5 \mu\text{M}$). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e o cultivo mantido por 21 dias. Após esse período, as células foram submetidas à coloração com *Oil Red* a fim de evidenciar as gotículas lipídicas, presentes no interior das células que se coram em vermelho (Figura 3b).

As CTMs foram induzidas à diferenciação osteogênica fazendo-se o cultivo de 5×10^4 células/poço em placas de seis poços, e mantidas em cultura por 21 dias em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, acrescido de ácido ascórbico ($50 \mu\text{g/ml}$), β -glicerofosfato (10mM) e dexametasona ($0,1 \mu\text{M}$). Para adequada nutrição celular o meio de cultura era substituído a cada três dias. Após esse período, as células foram submetidas à coloração pelo método de von Kossa a fim de evidenciar nódulos de mineralização representados pela coloração marrom (Figura 3c).

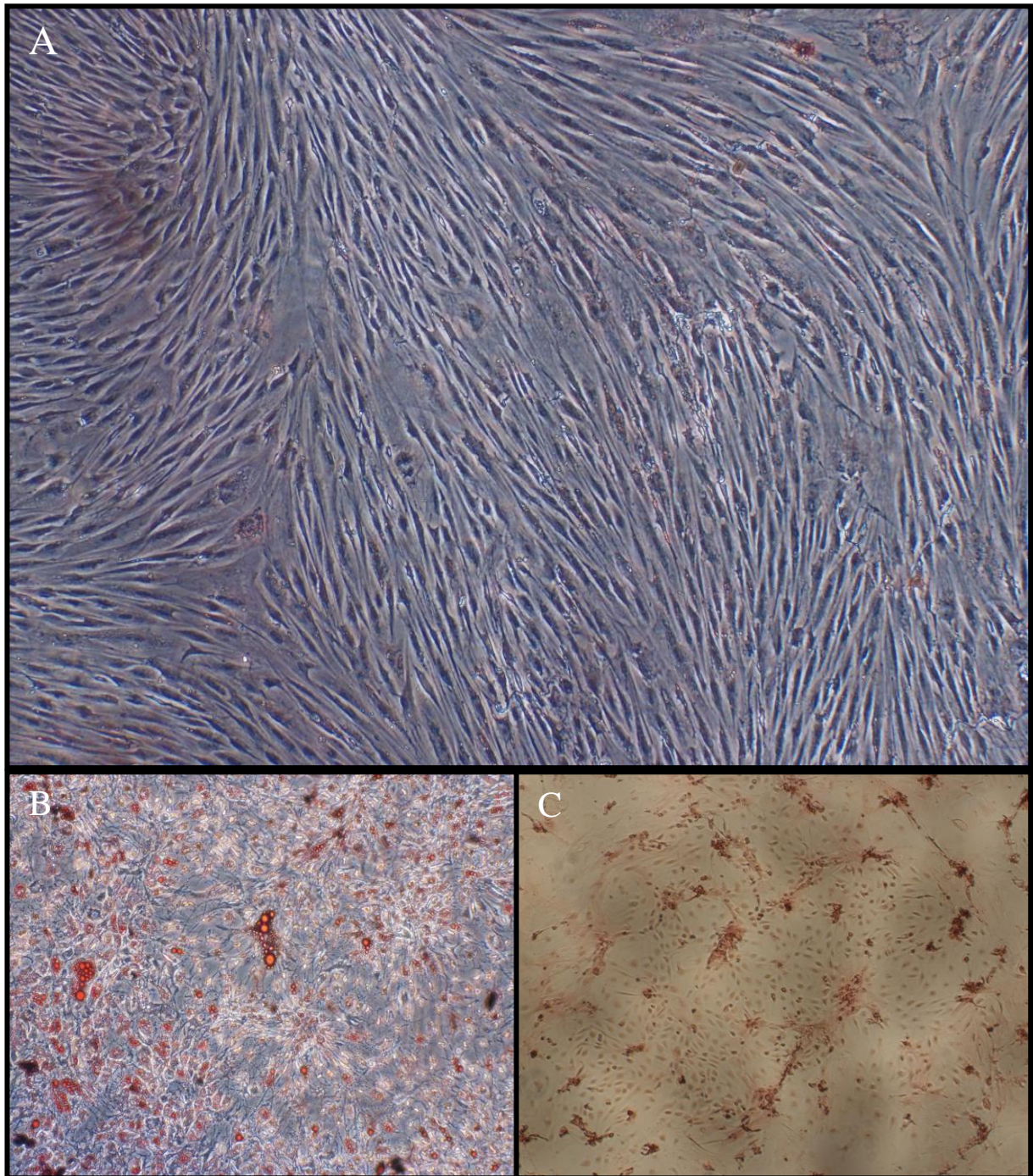


Figura 3- Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo de coelhos Nova Zelândia indiferenciadas e submetidas à diferenciação induzida *in vitro*. A) CTMs indiferenciadas cultivadas de forma usual e utilizadas como controle dos ensaios de diferenciação (400X). B) CTMs cultivadas em meio adequado para indução de diferenciação adipogênica após coloração com *Oil Red* (400X). Observam-se as gotículas de gordura coradas em vermelho. C) CTMs cultivadas em meio adequado para indução de diferenciação osteogênica após coloração com *Von Kossa* (400X). Observa-se matriz mineralizada com uma coloração amarronzada.

3.6. COLETAS DE SANGUE E ANÁLISES LABORATORIAS

Amostras sanguíneas foram coletadas antes e após três, seis, nove e 12 dias da inoculação do veneno. Nos dias de coleta, foram retirados três ml de sangue na veia marginal da orelha com o auxílio de um cateter 24. Uma alíquota (1 ml) foi coletada em um frasco contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% para determinação dos parâmetros hematológicos realizados imediatamente após a coleta. Outra alíquota (1 ml) foi coletada em tubo contendo citrato de sódio para avaliações do tempo de protombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) realizados imediatamente após a coleta. O restante da amostra (1 ml) foi acondicionado em tubos plásticos sem anticoagulante para produção soro e congelados para posterior análise bioquímica.

As análises hematológicas e bioquímicas plasmáticas foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Patologia Veterinária da EV- UFMG

3.6.1. Avaliação hematológica

O hemograma foi realizado no analisador hematológico veterinário (Poch-100iV Diff®) utilizando-se o sangue coletado com EDTA a 10% para determinar o número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, volume globular (VG), concentração da hemoglobina e índices hematimétricos: volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM). Os esfregaços sanguíneos foram realizados em lâminas de vidro² (26x76mm) (Lâminas para microscopia não lapidada, Exacta,) e corados com Panótico rápido (Panótico rápido LB, Laborclin) para contagem diferencial de leucócitos em microscopia óptica.

3.6.2. Coagulograma

Visando avaliar os efeitos sobre a funcionalidade do sistema da coagulação nos animais submetidos a diferentes tipos de tratamentos pós-inoculação do veneno de *L. laeta*, o tempo de protombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) foram mensurados. Para isso, o sangue coletado em tubos contendo citrato, foi centrifugado à 3.000 rpm por 10 minutos. Os valores foram obtidos após o processamento utilizando-se o aparelho QUICK TIMER e os kits TP e TTPa Clot (Bios diagnóstica).

3.6.3. Avaliação bioquímica

O sangue armazenado em frascos sem anticoagulantes foram centrifugados à 3.000 rpm durante cinco minutos para obtenção do soro. Esse material foi utilizado para determinações de proteína total sérica, por meio de refratometria, e de creatinaquinase (CK) e sua fração MB, lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST) uréia e creatinina por método colorimétrico cinético (TP Analyser basic®- Thermo Plate) de acordo com o protocolo dos kits comerciais de diagnóstico (Kits Bioclin). O perfil protéico fracionado foi realizado por eletroforese, utilizando gel de agarose (Filme de Agarose Geral CELMGEL®-CELM) em tampão Tris (Tampão Tris para eletroforese em CELMGEL®-CELM). A corrida eletroforética obtida foi submetida à coloração com amido negro, e a concentração de albumina e globulinas (alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 e gama) foi determinada pelo software CELM SE-250.

3.7. AVALIAÇÃO DA ÁREA DAS FERIDAS

As feridas foram avaliadas e mensuradas diariamente, a fim de verificar a evolução de acordo com o tratamento instituído. Registros fotográficos diários foram realizados com a câmera digital (CANON REBEL XSI EOS zoom de 24 mm), mantida a uma distância constante de 50 cm da ferida. Os dados coletados foram armazenados e utilizados para avaliação da área das lesões com o auxílio do programa IMAGE PRO. Para a análise da contração da ferida, foram considerados os períodos de 3, 6, 9 e 12 dias. O percentual de contração de cada lesão foi calculado utilizando modelo matemático proposto por Oliveira et al. (2000): $[(\text{área inicial} - \text{área do dia da mensuração}) / \text{área inicial}] \times 100$.

3.8. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES

Após transcorrido o período de 12 dias de tratamento e observação, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com propofol (>10mg/kg) para avaliação histopatológica da lesão cutânea. Os fragmentos obtidos foram fixados em formol a 10% (órgãos internos) e paraformol por 48 horas após a eutanásia (pele) e processados por técnica rotineira de inclusão em parafina para realização posterior de cortes histológicos de 6 µm de espessura.

Os cortes e as etapas de preparação, colorações foram realizados no Laboratório de Patologia Comparada da Universidade Federal de Minas Gerais. Os cortes foram submetidos à análise de microscopia óptica de luz convencional, após as colorações de hematoxilina-eosina (H.E), para a avaliação histomorfométrica, tricromio de Massom para avaliação das fibras colágenas, e van kossa, para avaliação de mineralização tecidual. Além disso, utilizou-se microscopia de luz polarizada, após coloração com Picro-sirius Red para caracterização e quantificação dessas fibras.

3.8.1. Avaliação da morfologia tecidual por hematoxilina-eosina

Para avaliação microscópica após coloração por H.E, foram obtidas imagens digitais de campos histológicos na objetiva de 10 e 40 com o auxílio do microscópio Accu Scope acoplado ao programa de captura de imagem TCS pro 500.

A avaliação descritiva de todas as lâminas foi realizada por um patologista sem o conhecimento dos grupos. Foram avaliadas alterações na estrutura morfológica da epiderme, derme superficial, profunda e camada muscular, além da intensidade e característica de infiltrado inflamatório além de outros achados específicos como hemorragia e mineralização tecidual

3.8.2. Avaliação da fibrose pela coloração de tricrômico de Massom

Para a avaliação das fibras colágenas totais, foi realizada a coloração tricrômio de Massom, em que tais fibras podem ser avaliadas pela sua coloração azulada. Para quantificação dessas fibras foi utilizado o software IMAGE J após registro fotográfico com o programa de captura de imagem TCS pro 500 acoplado ao microscópio Accu Scope na objetiva de 40.

3.8.3. Diferenciação de fibras colágenas pela coloração Picro-sirius Red

A avaliação de Picro-sirius Red foi realizada para identificação e quantificação de fibras colágenas tipo I e III. Foram realizadas seis fotos em campos aleatórios de cada lâmina na objetiva de 40, com o auxílio do microscópio LEICA CORE acoplado ao programa de captura de imagem LEICA APPLICATION SUÍTE CORE. As imagens obtidas foram avaliadas com o software IMAGE J a fim de calcular a área em pixels ocupada por cada tipo de colágeno. As fibras colágenas do tipo I aparecem com coloração avermelhada, já as do tipo III aparecem com coloração esverdeada.

3.8.4. Avaliação de calcificação tecidual por von Kossa

Essa técnica foi empregada para confirmar a calcificação nas lâminas em que se suspeitou após leitura de H.E. Imagens digitais foram obtidas de campos histológicos na objetiva de 10 e 40 com o auxílio do microscópio Accu Scope acoplado ao programa de captura de imagem TCS pro 500.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nesse estudo foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas e um nível de significância ($p < 0,05$). Cada resultado foi submetido ao teste de normalidade por Shapiro-Wilks e Kolmogorov e avaliados conforme descrito abaixo:

A) Comparação de médias por análise de variância pelo teste de Tukey:

-Tempo de trombina e tromboplastina parcialmente ativada, hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média, uréia, albumina, avaliação do colágeno tipo III, avaliação de fibras colágenas após coloração com tricrômico de Masson e percentual de contração das feridas.

B) Comparação de médias por análise de variância pelo teste de Tukey após transformação logarítmica dos dados:

- Número de eritrócitos, volume globular, volume corpuscular médio, número de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos, proteína total, alfa 2, beta 1 e 2, aferição do colágeno tipo I, valores séricos de aspartato aminotransferase, creatina quinase e creatina quinase fração MB.

C) Comparação de médias por análise de variância pelo teste de Tukey após transformação raiz quadrada dos dados:

- Número de plaquetas, creatinina sérica, alfa 1 e gama globulinas.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção dos animais e dose de veneno inoculado

A seleção do coelho como modelo experimental foi baseada em estudos anteriores que apontam essa espécie como a melhor para simular lesão dermonecrótica semelhante à que ocorre no homem (Silva et al., 2004; Elston et al., 2005).

A uniformização dos animais, tanto em sexo, como idade e peso, são fundamentais para a avaliação estatística adequada, reduzindo o número de variáveis que poderiam interferir nos resultados avaliados (Sampaio, 2007). Portanto acredita-se que a escolha de machos e as condições de adaptação dos animais pelo período de cinco dias minimizam a influência do estrógeno e do cortisol, respectivamente, na reparação das feridas (Martins et al., 2006). A escolha da dose, 20 µg de veneno de *L. laeta*, foi baseada em diversos estudos experimentais que utilizaram doses semelhantes capazes de induzir lesão dermonecrótica significativa (Phillips et al., 1995; Elston et al., 2005; Pauli et al., 2009) e também num estudo piloto.

4.2. Transplante das células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo

Realizou-se o transplante alogênico das CTMs, para que os animais submetidos ao envenenamento não fossem submetido à qualquer situação estressante, e assim evitar interferências na cicatrização das feridas, o que poderia comprometer a avaliação dos tratamentos instituídos.

Para esse experimento optou-se o isolamento das CTMs a partir do tecido adiposo da região interescapular dos animais. As CTMs oriundas desse tecido estão ganhando importância e sua utilização está cada vez mais frequente em experimentos envolvendo CTMs. O fácil isolamento, excelente capacidade proliferativa, e obtenção de grande quantidade de células em um único procedimento determinam a escolha dessas células. Essas características possibilitam a utilização de menor número de animais doadores quando comparado à extração de CTMs da medula óssea. Um estudo piloto realizado por nossa equipe comprovou as afirmativas acima, observando-se que a quantidade de CTMs obtidas e a rapidez de proliferação e expansão celulares, foram bastante superiores com a utilização de tecido adiposo.

4.3. Avaliação hematológica

Foram observadas diminuições na contagem eritrocitária ($p < 0,05$), na concentração de hemoglobina e no volume globular (neste último parâmetro exceto para

o grupo que recebeu tratamento com células-tronco mesenquimais) três dias após a inoculação do veneno em todos os grupos que receberam veneno, independentemente do tratamento instituído, com retorno à normalidade seis dias após a inoculação do veneno (Tabela 1, 2 e 3). Esses resultados indicam uma discreta anemia também relatada por Tavares et al. (2004) podendo ser decorrente da hemorragia observada macro e microscopicamente no local da ferida. Silva et al. (2003) relataram que os eritrócitos dos coelhos são resistentes à hemólise induzidas pelo veneno de *Loxosceles* spp., provavelmente, pela ausência de glicoforina na superfície dos eritrócitos dessa espécie, que um importante alvo para os componentes hemolíticos do veneno. Todavia, Barreto et al. (2007), observaram que o veneno de *L. gaucho*, apesar de não ocasionar hemólise em coelhos, foi capaz de alterar a função dos eritrócitos por alteração na permeabilidade de membrana. Sabe-se que alterações precoces nos parâmetros hematológicos são difíceis de ser observadas em acidentes envolvendo humanos e animais, já que a maioria dos pacientes é admitida à consulta após 48 horas do acidente (Malaque et al., 2002).

Tabela 1- Valores médios do número de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	Dap+CTMs
0	4,79	4,79 ^A	4,44 ^A	4,66 ^A	5,13 ^A
3	4,83 ^a	3,75 ^{Bb}	3,79 ^{Bb}	3,82 ^{Bb}	3,92 ^{Cb}
6	4,61	4,07 ^{BC}	4,04 ^{AB}	4,05 ^{AB}	4,22 ^{BC}
9	4,46	4,50 ^{AC}	4,43 ^A	4,25 ^{AB}	4,69 ^{AB}
12	4,24 ^a	5,19 ^{Ab}	4,45 ^{Aab}	4,46 ^{Aab}	4,48 ^{ABCab}

*Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente ($p < 0,05$).

* Valores de referência de eritrócitos totais segundo Carpenter (2012): 4-8 $\times 10^6/\mu\text{l}$

Tabela 2- Valores médios do volume globular (%) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	Dap+CTMs
0	32,60	30,88 ^{AB}	29,52	29,66	33,42
3	32,86 ^{ab}	25,14 ^{Ac}	26,34 ^{bc}	40,42 ^a	26,86 ^{abc}
6	31,24	29,20 ^{AB}	29,04	28,58	29,10
9	30,44	31,76 ^{AB}	31,18	30,02	32,30
12	30,42	36,14 ^B	31,50	31,48	30,68

*Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente (p< 0,05).

* Valores de referência do hematócrito segundo Carpenter (2012): 30-50%

Tabela 3- Valores médios da concentração de hemoglobina (g/dL) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	Dap+CTMs
0	10,66	10,18	9,66	10,22	10,72
3	11,14 ^a	7,94 ^b	8,24 ^b	8,18 ^b	8,22 ^b
6	10,22	9,39	8,94	9,04	9,20
9	10,10	10,16	9,92	9,34	10,08
12	9,98 ^{ab}	11,86 ^a	9,76 ^b	9,94 ^{ab}	9,82 ^b

Os dados foram analisados pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente (p< 0,05).

* Valores de referência da concentração de hemoglobina segundo Carpenter (2012): 8-17,5 g/dL

Em relação ao leucograma observou-se leucocitose significativa nos grupos CP, DAP e CTMs, três dias após a inoculação do veneno (Tabela 4), principalmente por aumento de neutrófilos e linfócitos (Tabela 5). Esses valores são similares aos observados por Tavares et al. (2004) e Mcglasson et al. (2007) 72 horas após a inoculação de 10 µg de veneno de *L. gaucho* e *L. reclusa* respectivamente, em coelhos.

Tabela 4- Valores médios do número de leucócitos totais (µl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados

com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	CTMs + Dap
0	7.325 ^{AB}	5.096 ^A	6.200 ^A	9.120 ^A	6.620
3	11.180 ^B	15.088 ^B	15.342 ^B	16.360 ^B	10.440
6	5.380 ^A	5.292 ^A	5.660 ^A	5.400 ^A	6.700
9	5.280 ^A	4.700 ^A	5.940 ^A	5.820 ^A	6.500
12	5.380 ^A	4.600 ^A	4.700 ^A	5.480 ^A	6.120

*Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente (p<0,05).

* Valores de referência de número de leucócitos totais (X 10³/μl) segundo Carpenter (2012): 5-12.

A observação do número de leucócitos na circulação sanguínea é variável e dependente do tempo de coleta após o envenenamento, assim como da dose do veneno aplicada (Silva et al., 2003; Mcglasson, et al., 2007, Malaque et al., 2011). Silva et al. (2003) observaram leucopenia intensa em coelhos, 24 horas após a inoculação do veneno de *L. intermedia*, com posterior normalização do número de leucócitos cinco dias após o envenenamento. A leucopenia está relacionada á neutropenia observadas no mesmo período. Esse fato ocorre pela migração massiva de neutrófilos para o tecido, horas após o acidente, ocasionando em um decréscimo transitório de leucócitos na circulação sanguínea (Tavares et al., 2004). No presente estudo não se observou leucopenia durante o período experimental e sim leucocitose três dias após a inoculação do veneno. Todavia, no grupo Dap+CTMs o número de leucócitos totais, assim como de neutrófilos e linfócitos permaneceram dentro dos valores fisiológicos para a espécie durante todo o período experimental. 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 (Smith e Micks, 1970, Elston et al., 2000; Ospedal et al., 2002).

Tabela 5- Valores médios do número de neutrófilos, linfócitos e monócitos (μl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

	Tempo (T) (dias)	Grupos				
		CN	CP	Dap	CTMs	Dap+CTMs
Neutrófilos (x10 ³ cels/ μ l)	0	5,09±1,97 ^{AB}	3,21±1,7 ^A	4,27±1,49 ^A	4,31±2,06 ^A	4,93±1,20
	3	7,52±3,58 ^A	8,93±9,0 ^B	9,48±3,88 ^B	10,46±2,28 ^B	7,28±4,27
	6	1,84±0,59 ^B	2,77±1,3 ^A	2,36±0,86 ^{AC}	2,56±1,32 ^A	3,89±1,06
	9	2,94±1,53 ^B	1,86±0,1 ^A	2,02±1,03 ^C	3,03±0,32 ^A	3,59±0,82
	12	3,67±1,28 ^{AB}	2,60±0,9 ^A	2,85±0,49 ^{AC}	3,33±0,70 ^A	4,51±1,04
Linfócitos (x10 ³ céls/ μ l)	0	1,91±0,95	1,69±0,61 ^A	1,4±0,25 ^A	0,43±0,46	1,47±0,66
	3	4,09±0,25	5,68±4,09 ^B	5,6±4,5 ^C	5,10±0,46	3,06±0,29
	6	2,48±1,32	3,10±0,6 ^{AB}	3,02±0,28 ^{ABC}	2,73±0,48	2,44±0,63
	9	2,39±0,73	2,07±0,6 ^{AB}	3,16±0,79 ^{BC}	2,64±0,74	2,78±0,24
	12	1,51±0,48	2,42±1,91 ^A	1,72±0,56 ^{AB}	1,93±0,48	1,36±0,23
Monócitos (x10 ³ céls/ μ l)	0	0,3±0,15 ^{AB}	0,21±0,07 ^A	0,49±0,35 ^A	0,31±0,08 ^A	0,28±0,09 ^{AB}
	3	0,69±0,13 ^B	0,89±0,17 ^B	0,74±0,14 ^A	0,79±0,3 ^C	0,42±0,25 ^B
	6	0,23±0,09 ^A	0,26±0,13 ^A	0,17±0,13 ^B	0,09±0,01 ^B	0,26±0,16 ^{AB}
	9	0,16±0,03 ^A	0,17±0,05 ^A	0,11±0,06 ^B	0,14±0,03 ^B	0,13±0,04 ^A
	12	0,14±0,06 ^A	0,16±0,06 ^A	0,14±0,59 ^B	0,15±0,11 ^B	0,25±0,15 ^{AB}

*Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente ($p < 0,05$).

A avaliação plaquetária é um importante parâmetro para avaliação da hemostasia dos animais acometidos pelo loxoscelismo, já que a coagulação intravascular é um achado constante nessa síndrome (Elston, 2000). A trombocitopenia ocorre de forma precoce nos acidentes por *Loxosceles* spp., devido ao consumo intenso durante a hemorragia no local da picada (Silva et al., 2003). Valores mínimos de plaquetas foram observados 24 horas após o envenenamento (Pauli et al., 2009), com reestabelecimento da normalidade cerca de 72 horas após. No presente estudo, apesar de terem sido observadas algumas diferenças ($p < 0,05$), principalmente com relação ao tempo, não foram vistas alterações relevantes de trombocitopenia, com exceção na última coleta do grupo CP (Tabela 6). Esse valor não pode ser relacionado ao tratamento instituído e nem mesmo à ação do veneno, já que trata-se de um grupo que recebeu como tratamento PBS, considerada uma substância inerte, e ao fato que a trombocitopenia é um evento precoce e transitório assim como observado em diversos estudos (Tavarez et al., 2004; Pauli et al., 2009).

Tabela 6- Valores médios do número de plaquetas ($X 10^3/\mu\text{l}$) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	Dap+CTMs
0	291,00 ^{AB}	273,60 ^{AB}	212,00 ^A	299,00 ^A	315,20 ^A
3	220,80 ^A	378,80 ^B	343,60 ^{AB}	365,40 ^A	359,20 ^A
6	390,00 ^{Ba}	540,70 ^{Cab}	501,60 ^{Cab}	615,80 ^{Bb}	588,80 ^{Bb}
9	405,20 ^B	295,00 ^B	406,20 ^{BC}	431,80 ^A	426,40 ^A
12	413,00 ^{Ba}	135,00 ^{Ab}	304,80 ^{ABab}	351,60 ^{Aa}	387,00 ^{Aa}

*Para avaliação estatística os dados sofreram transformação raiz quadrada e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente ($p < 0,05$).

* Valores de referência do número de plaquetas, segundo Carpenter (2012): $290-650 X 10^3/\mu\text{l}$

4.4. Coagulograma

A aferição do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) são medidas importantes que auxiliam na avaliação da hemostasia do animal, representando os fatores extrínsecos e intrínsecos da cascata de coagulação respectivamente (Kaneko, 2008).

Os valores de TP (Tabela 7), e TTPa (Tabela 8) permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie durante todo o experimento, inferindo-se que não houve ativação generalizada da cascata de coagulação, assim como evidenciou Tavares et al. (2004).

É possível que durante as primeiras horas alguns fatores da coagulação tenham sido consumidos no sítio lesional, devido aos distúrbios hemorrágicos que ocorrem no local. A normalidade do TP e TTPa pode ser explicada pelo fato que, o aumento dos tempos em ambos os testes somente ocorre com depleção de mais de 70% de pelo menos um dos fatores envolvidos nas cascatas intrínsecas e extrínsecas (Kaneko, 2008).

Tabela 7- Valores médios do tempo de protrombina (segundos) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados

com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	CTMs + Dap
0	8,00	8,94	8,72	8,86	8,62
3	8,10	7,84	7,46	7,66	7,44
6	8,44	8,10	7,80	7,64	7,80
9	8,38	7,54	8,36	8,00	7,84
12	8,14	8,50	8,72	8,24	8,36

Os dados foram analisados pelo teste de Tukey, $p > 0,05$

Tabela 8- Valores médios do tempo de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (segundos) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	CTMs+ Dap
0	19,86	20,49 ^A	19,52 ^{AB}	15,20 ^{AB}	14,00
3	18,52 ^{ab}	12,82 ^{ab}	20,58 ^{bAB}	20,36 ^{bBC}	15,04 ^{ab}
6	17,16	17,84 ^{AB}	13,84 ^A	12,60 ^A	14,50
9	15,30	17,66 ^{AB}	14,40 ^{AB}	17,26 ^{AB}	15,82
12	19,52 ^{ab}	17,82 ^{aAB}	20,26 ^{abB}	25,72 ^{bC}	18,98 ^{ab}

Os dados foram analisados pelo teste de Tukey.

* Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente ($p < 0,05$).

4.5. Avaliação bioquímica

A uréia e creatinina são analitos avaliados rotineiramente para avaliação da função excretora renal, e com isso são utilizadas para verificar a possibilidade do desenvolvimento de insuficiência renal, após lesão, seja ela aguda ou crônica. Já foi demonstrado que o veneno da *Loxosceles* spp. pode atuar diretamente nos túbulos e glomérulos renais, ocasionando em edema glomerular e nefrose tubular e conseqüentemente em insuficiência renal aguda (Chaim et al., 2006). Porém sabe-se também que a hemoglobina plasmática liberada durante a hemólise intravascular no loxoscelismo cutâneo-visceral é uma das causas de insuficiência renal (Tavares et al., 2004). No presente estudo, não foram observadas diferenças nos valores séricos de uréia

(Tabela 9) e creatinina em relação aos padrões fisiológicos para a espécie (Carpenter, 2012). Com exceção do nono dia pós-inoculação de veneno em que se observou diferença ($p < 0,05$) para a creatinina entre o grupo CN (animais saudáveis) e o grupo CP (animais envenenados tratados com PBS), não foram observadas outras diferenças entre os tratamentos e tempos de coleta para esse analito (Tabela 10). Essa diferença apesar de estatisticamente comprovada, não tem significado clínico, pois os valores se mantiveram entre os valores fisiológicos para a espécie durante todo o período (Carpenter, 2012). Portanto pode ser explicada por variações individuais, já que valores mais altos de creatinina, no grupo controle negativo já eram encontrados desde a primeira coleta.

Tabela 9- Valores médios da concentração de ureia sérica (mg/dl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	CTMs + Dap
0	31,60	28,45	19,31	24,55	21,90
3	25,03	27,80	25,40	28,90	25,73
6	26,49	20,63	24,81	28,61	25,29
9	25,78	31,05	31,32	31,24	26
12	28,68	30,28	24,84	32,26	29,10

Os dados foram analisados pelo teste de Tukey, $p > 0,05$.

*Valores de referência de uréia sanguínea, segundo Carpenter (2012): 15-50 mg/dl

Tabela 10- Valores médios da concentração de creatinina sérica (mg/dl) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	CTMs + Dap
0	1,48	0,54	0,52	0,60	0,86
3	2,02	1,02	0,78	0,71	0,94
6	2,42	1,51	0,91	1,09	0,88
9	2,55 ^a	0,59 ^b	0,78 ^{ab}	0,83 ^{ab}	0,94 ^{ab}
12	1,95	1,14	0,96	0,89	0,96

Para avaliação estatística os dados sofreram transformação raiz quadrada e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas linhas ($p < 0,05$).

* Valores de referência de creatinina sanguínea segundo Carpenter (2012): 0,5-2,6 mg/dl

A creatina quinase é uma enzima encontrada em pequenas quantidades em todos os tecidos musculares, inclusive no tecido cardíaco. O aumento de seus valores associados ao aumento de sua isoenzima MB é considerado marcador para o diagnóstico e acompanhamento de lesão cardíaca ou infarto do miocárdio (Kaneko et al., 2008). No presente estudo todos os grupos apresentaram valores acima dos de referência para a espécie (Kaneko et al., 2008), porém diferenças estatísticas somente foram observadas nos grupos que receberam veneno, independentemente do tratamento instituído (Tabela 11). Aumento significativo foi observado três dias após a coleta em todos os grupos. Percebeu-se a grande flutuação desta enzima neste estudo, dificultando a sua interpretação. Esses valores indicam uma possível ação cardiotóxica do veneno de *L. laeta* em coelhos, assim como ineficácia das terapias instituídas em diminuir essa possível lesão cardíaca. Lopes et al. (2010) observaram aumento dessas enzimas em camundongos, 4 horas após a inoculação experimental de veneno de *L.intermedia*, associado ao encontro de frações do veneno no tecido cardíaco. Aumento de CK isolada, assim como observaram França et al. (2002) em um relato de dois casos, sugere processo de rabdomiólise.

Tabela 11- Valores médios da concentração de creatina quinase sérica e sua fração MB (U/L) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

	Tempo (T)		Grupos			
	(dias)	CN	CP	Dap	CTMs	Dap+CTMs
Creatinaquinase	0	635,22 ^a	1199,75 ^{abAB}	1016,02 ^{abA}	1324,98 ^{abA}	1849,05 ^{bAB}
	3	757,04 ^a	1993,42 ^{abB}	2273,12 ^{bB}	3081,26 ^{bB}	3253,58 ^{bBC}
	6	571,62 ^a	1930,35 ^{bB}	1546,68 ^{abAB}	1762,77 ^{bAB}	1928,16 ^{bABC}
	9	463,01 ^a	522,16 ^{abA}	777,76 ^{abA}	973,02 ^{abA}	1412,84 ^{bA}
	12	471,92 ^a	792,70 ^{abA}	1047,85 ^{abAB}	1742,32 ^{bcAB}	3713,5 ^{cC}
Fração MB	0	626,18	739,89 ^{AB}	694,5	1138,30	1598,2
	3	744,80	1834,25 ^B	1191,43	1802,77	2672,46
	6	686,5	1253,48 ^{AB}	1444,96	1166,91	1919,71
	9	400,07 ^a	476,22 ^{abA}	608,78 ^{ab}	922,50 ^{ab}	1267,66 ^b
	12	406,74 ^{ab}	296,03 ^{aA}	716,63 ^{ab}	1167,80 ^{bc}	2410,09 ^c

*Para avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se a valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas respectivamente (p< 0,05).

O aumento nas concentrações plasmáticas de AST é um bom indicador de lesão de hepatócito, pois essas enzimas são bastante ativas no fígado e podem ser facilmente detectáveis em discretas quantidades. Essas também podem estar presentes em outras células, como as musculares e eritrócitos, sendo liberadas devido a lise celular bem como aumento da permeabilidade de membrana (Kaneko, 2008).

Apesar de Christoff et al. (2008), terem encontrado frações de veneno no fígado, associados à micro lesões nos hepatócitos e aumento precoce nas enzimas hepáticas, no presente estudo não foram observadas alterações nos valores da AST (Tabela 12). Segundo Malaque et al. (2011), a observação do aumento dessa enzima em 9% dos pacientes humanos atendidos em um hospital de São Paulo, está relacionada a hemólise massiva, e associada ao aumento nos valores de bilirrubina indireta, principalmente nos pacientes que foram diagnosticados com loxoscelismo cutâneo-visceral. A ausência de alteração nos valores de AST nesse experimento pode ser explicada pela ausência de alterações hemolíticas, bem como ausência do loxoscelismo cutâneo-visceral nos coelhos envenenados. Somente foi observado maior valor médio de AST (p<0,05) no

grupo CN quando comparado ao grupo CP nove dias após a inoculação do veneno. Este valor observado no CN nesse período não tem significado clínico, já que os valores se mantiveram dentro dos valores de referência, e pode ser explicado pela variação individual entre a espécie (Carpenter, 2012).

Tabela 12- Valores médios da concentração de aspartato aminotransferase (U/L) de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Dias	CN	CP	Dap	CTMs	CTMs + Dap
0	59,93	35,55	57,50	63,54	79,13
3	47,38	36,06	54,04	47,44	54,04
6	78,16	50,77	55,71	61,75	59,38
9	94,65 ^a	28,88 ^b	47,97 ^{ab}	54,15 ^{ab}	41,75 ^{ab}
12	107,83	47,48	73,96	49,95	63,51

*Para a avaliação estatística os dados sofreram transformação logarítmica 10 e foram analisados pelo teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes referem-se a valores estatisticamente significativos nas linhas ($p < 0,05$).

* Valores de referência séricos de AST segundo Carpenter (2012): 12-113 U/L.

O proteinograma e o fracionamento eletroforético são ferramentas auxiliares que podem ser utilizadas no diagnóstico de afecções infecciosas, traumáticas e inflamatórias como ocorre no loxoscelismo. Nos coelhos o traçado eletroforético das proteínas plasmáticas revelou seis bandas distintas: albumina, alfa-globulinas 1 e 2, beta-globulinas 1 e 2 e gama-globulinas (Figura 4). Os valores observados no tempo 0 em todos os grupos estão de acordo com Ozkan et al. (2012), que observaram que a proteína total pode variar de 4,5-12,2 mg/dL em coelhos adultos.

No presente trabalho observou-se decréscimo de albumina associados ao aumento de alfa-1 e alfa-2 globulina e normalidade nos valores de gama globulinas séricas em todos os grupos no terceiro dia após a inoculação do veneno de *L. laeta*, com diferença ($p < 0,05$) observada somente na fração alfa-2 globulina (Tabela 13). Esse perfil eletroforético é encontrado nos processos inflamatórios agudos (Silva et al., 2005). A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa de processos inflamatórios, já que tem sua síntese alterada pelo fígado em resposta à uma variedade

de estresses como inflamações, infecção bacteriana e toxinas (Silva et al., 2005). Já a alfa-1 globulina é uma fração composta principalmente pela haptoglobina, considerada uma importante proteína de fase aguda positiva, aumentando suas concentrações em processos inflamatórios. Há ainda que se considerar que a haptoglobina aumenta em processos hemolíticos (Barreto et al., 2007), o que não ocorre nos coelhos expostos ao veneno, justificando a falta de aumento estatístico considerável observado na alfa-1 globulina.

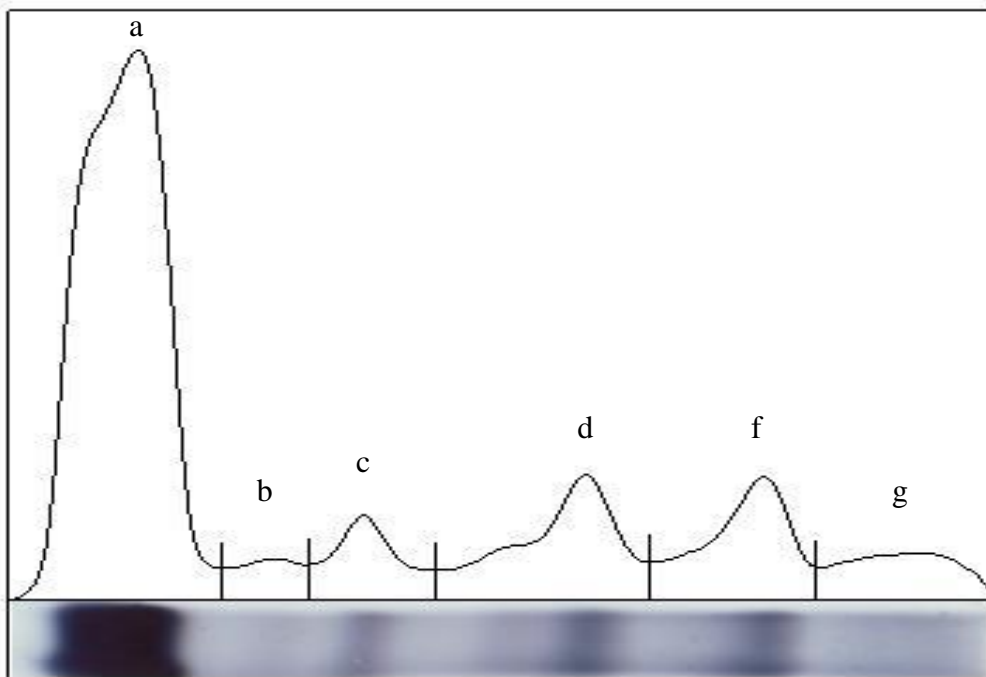


Figura 4- Traçado eletroforético das proteínas plasmáticas dos coelhos em que observam-se seis bandas distintas: a) albumina, b) alfa-globulinas 1, c) alfa-globulinas 2, d) beta-globulinas 1, e) beta-globulinas 2, f) gama globulinas.

Tabela 13- Valores médios de proteína total, albumina, alfa globulinas (1 e 2), beta globulinas (1 e 2) e gama globulinas de coelhos inoculados com água ultrapura (CN) e de coelhos, antes e após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*, tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de Dap e CTMs.

Tempo/ Parâmetros		0	3	6	9	12
Proteína total (mg/dL)	CN	4,7	5,15	5,33	4,5	4,53
	CP	5,92	5	5	6,2	5,7
	DAP	5,35	5,52	5,24	4,84	5,28
	CTMs	5,26	5,52	5,12	4,84	5,68
	DAP+CTMs	5,28 ^{ab}	6,12 ^b	4,96 ^{ab}	4,76 ^a	5,9 ^b
Albumina (mg/dL)	CN	3,56	3,14	2,94 ^{AB}	2,7	3,06
	CP	3,54	3	3,48 ^{AB}	3,45	3,32
	DAP	3,53	2,9	2,82 ^{AB}	2,91	3,38
	CTMs	3,6 ^a	2,89 ^{ab}	2,53 ^{Bb}	2,94 ^{ab}	3,36 ^{ab}
	DAP+CTMs	3,31	2,81	2,73 ^{AB}	2,94	3,58
Alfa-1 (mg/dL)	CN	0,33	0,16	0,36	0,18	0,14
	CP	0,14	0,33	0,4	0,18	0,18
	DAP	0,16	0,18	0,53	0,18	0,15
	CTMs	0,18	0,2	0,22	0,19	0,19
	DAP+CTMs	0,18	0,27	0,28	0,17	0,16
Alfa-2 (mg/dL)	CN	0,34 ^{ab}	0,36 ^{ab}	0,43 ^{ABb}	0,34 ^{ab}	0,24 ^a
	CP	0,43 ^a	0,66 ^{bc}	0,67 ^{ABc}	0,44 ^a	0,45 ^{ab}
	DAP	0,39 ^{ab}	0,55 ^{bc}	0,79 ^{Bc}	0,38 ^{ab}	0,33 ^a
	CTMs	0,37 ^a	0,57 ^b	0,36 ^{Aa}	0,39 ^{ab}	0,48 ^{ab}
	DAP+CTMs	0,35 ^a	0,70 ^b	0,36 ^{Aa}	0,34 ^a	0,36 ^a
Beta-1 (mg/dL)	CN	0,40 ^{Aa}	0,67 ^{Aab}	0,89 ^b	0,66 ^{ab}	0,59 ^{Aab}
	CP	0,92 ^{Bab}	1,25 ^{Bb}	1,21 ^{ab}	0,97 ^{ab}	0,84 ^{ABa}
	DAP	0,69 ^{AB}	0,73 ^{AB}	0,83	0,7	0,8 ^{AB}
	CTMs	0,59 ^{AB}	0,82 ^{AB}	0,73	0,72	0,85 ^{AB}
	DAP+CTMs	0,95 ^{ABab}	1,09 ^{ABb}	0,80 ^{ab}	0,69 ^a	1,08 ^{Bab}
Beta-2 (mg/dL)	CN	0,25	0,46 ^A	0,60 ^{AB}	0,42	0,34
	CP	0,60 ^a	1,17 ^{Bc}	0,92 ^{Bbc}	0,83 ^{ab}	0,51 ^a
	DAP	0,40 ^a	1,00 ^{Bb}	0,43 ^{Aa}	0,46 ^a	0,41 ^a
	CTMs	0,35 ^a	0,85 ^{ABb}	0,55 ^{ABa}	0,43 ^a	0,58 ^{ab}
	DAP+CTMs	0,30 ^a	1,03 ^{Bc}	0,56 ^{ABb}	0,42 ^{ab}	0,52 ^{ab}
Gama (mg/dL)	CN	0,20	0,35	0,26	0,29	0,31
	CP	0,29	0,31	0,34	0,32	0,40
	DAP	0,19	0,16	0,16	0,20	0,22
	CTMs	0,18	0,18	0,20	0,17	0,23
	DAP+CTMs	0,20	0,21	0,22	0,20	0,20

Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas e linhas, respectivamente, submetidas à análise de variância e ao teste de Tukey com ($p < 0,05$).

4.6. Avaliação das feridas

A avaliação macroscópica efetuada diariamente, para fins de estadiamento, propiciou o acompanhamento sistemático da evolução da ferida dermonecrótica e as diferenças entre os grupos tratados. A dose de veneno de *L. laeta* administrada induziu uma típica lesão que se iniciou com a formação de um halo hemorrágico quatro horas após, associado à edema, eritema e discreta sensibilidade ao toque, variáveis em tamanhos conforme o indivíduo (Figura 5a). Após 48 horas verificou-se que a área hemorrágica se degradou em uma área central de necrose azulada (Figura 5b), dando lugar a formação de uma crosta quatro dias após a inoculação do veneno (Figura 5c), que no último dia de avaliação já estava pouco aderida à pele do animal (Figura 5d). Essas fases constituem a evolução da ferida dermonecrótica no loxoscelismo observada tanto em humanos como em alguns modelos animais (Ferrara et al., 2009; Pauli et al., 2009). Diferentemente dos ratos e camundongos, que não desenvolvem a ferida dermonecrótica, os coelhos são considerados o melhor modelo experimental para o estudo do loxoscelismo cutâneo (Silva et al., 2004; Elston et al., 2005). Observou-se, no entanto, que a evolução das feridas nos coelhos foi mais rápida do que a que ocorre nos humanos (Malaque et al., 2002; Silva et al., 2004; Tambourgi et al., 2010). Isso pode ser explicado pelo fato de se tratar de feridas experimentais, em que há maior controle do local lesional. Estudos clínicos e epidemiológicos em humanos relatam que 86,9% (Sezerino et al., 1998); 96,4% (Malaque et al., 2002) dos pacientes admitidos em hospitais de Santa Catarina e São Paulo respectivamente, apresentaram a forma cutânea da doença.

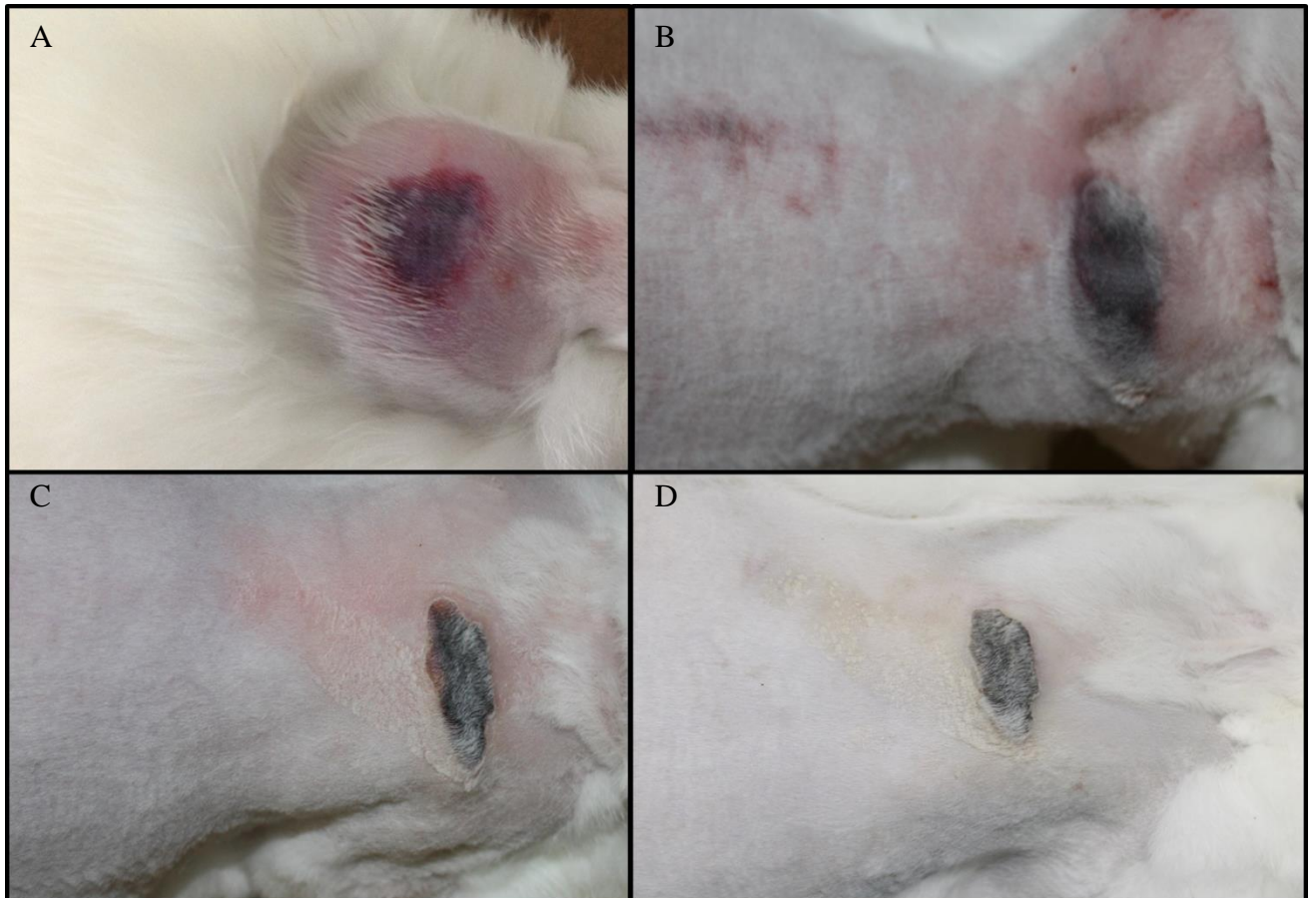


Figura 5- Evolução da ferida dermonecrótica de coelhos Nova Zelândia após inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*. A) Ferida com halo hemorrágico evidente quatro horas após a inoculação de veneno. B) Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose azulada, 48 horas após a inoculação do veneno. C) Ferida dermonecrótica com uma crosta bem definida, quatro dias após a inoculação do veneno. D) Ferida dermonecrótica no último dia de avaliação, observa-se que a crosta está pouco aderida à pele.

4.6.1. Avaliação morfométrica e obtenção do percentual de contração das feridas

A análise morfométrica para obtenção do percentual de contração das feridas durante a evolução do processo cicatricial mostrou ser um método eficiente e de fácil aplicabilidade. A avaliação da taxa de contração das feridas, e não da área por si, elimina as diferenças causadas por feridas de diferentes tamanhos iniciais, já que se obteve, mesmo inoculando a mesma quantidade de veneno nos animais, uma variabilidade grande dentro e entre os grupos experimentais.

Observa-se através das médias de contração das feridas, que os grupos tratados com CTMs e associação entre Dap+CTMs apresentaram recuperação tecidual mais rápida, do que o grupo controle positivo (Tabela 14). Além disso, observa-se que no ao final de 12 dias, o percentual de contração das feridas foi cerca de 15% maior quando utilizados como tratamento Dap, CTMs e associação entre as duas terapias, porém sem diferença significativa ($p>0,05$) (Figura 6).

As CTMs podem proporcionar uma cicatrização mais rápida e eficaz devido ao estímulo à reepitelização, estímulo à proliferação fibroblástica e estímulo para neovascularização, assim como observaram Neto et al. (2012) e Kim et al. (2013). Esses estímulos ocorrem principalmente por efeito parácrino, através de produção de fatores solúveis, como moléculas bioativas e fatores de crescimento que promovem microambiente para reparação tecidual (Caplan, 2007; Harman, 2013).

Os ensaios clínicos que utilizaram dapsona apresentam resultados contraditórios. O efeito benéfico da dapsona nas feridas dermonecroticas ocasionadas pelo loxoscelismo, assim como comprovada nesse experimento quando associada com CTMs, já foi observada por Rees et al. (1985), que utilizaram dapsona em ensaios clínicos com pacientes humanos, associado ou não com com excisão cirúrgica precoce e Barret et al. (1994) que utilizaram como modelo experimental cobaias. Por outro lado, Phillips et al. (1995) e Elston et al. (2005) não observaram diferenças estatísticas na diminuição do tamanho das feridas quando utilizaram a dapsona para o tratamento, utilizando coelhos como modelo experimental. Vale ressaltar que a taxa de contração das feridas é um método mais eficaz para avaliar a cicatrização de feridas que não são homogêneas inicialmente, assim como as feridas dermonecroticas advindas da inoculação do veneno de *Loxosceles* spp.

Tabela 14- Valores médios percentuais de contração de feridas cutâneas de coelhos após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta* tratados com PBS (CP), dapsona (Dap), células-tronco mesenquimais (CTMs) e associação de dapsona com células-tronco mesenquimais (Dap+CTMs)

Dia	CP	Dap	CTMs	Dap + CTMs
3	35,47±30,81 ^A	55,21±36,66 ^A	40,10±30,26 ^A	51,37±31,72 ^A
6	54,49±26,8 ^{AB}	76,77±22,9 ^{AB}	69,25±30 ^B	78,81±27,16 ^B
9	58,42±27,27 ^B	79,15±22,43 ^B	75,86±27,71 ^B	81,26±23,24 ^B
12	67,04±26,36 ^B	83,86±20,07 ^B	81,40±22,36 ^B	86,38±16,18 ^B

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes referem-se à valores estatisticamente significativos nas colunas, submetidas à análise de variância e ao teste de Tukey com ($p < 0,05$).

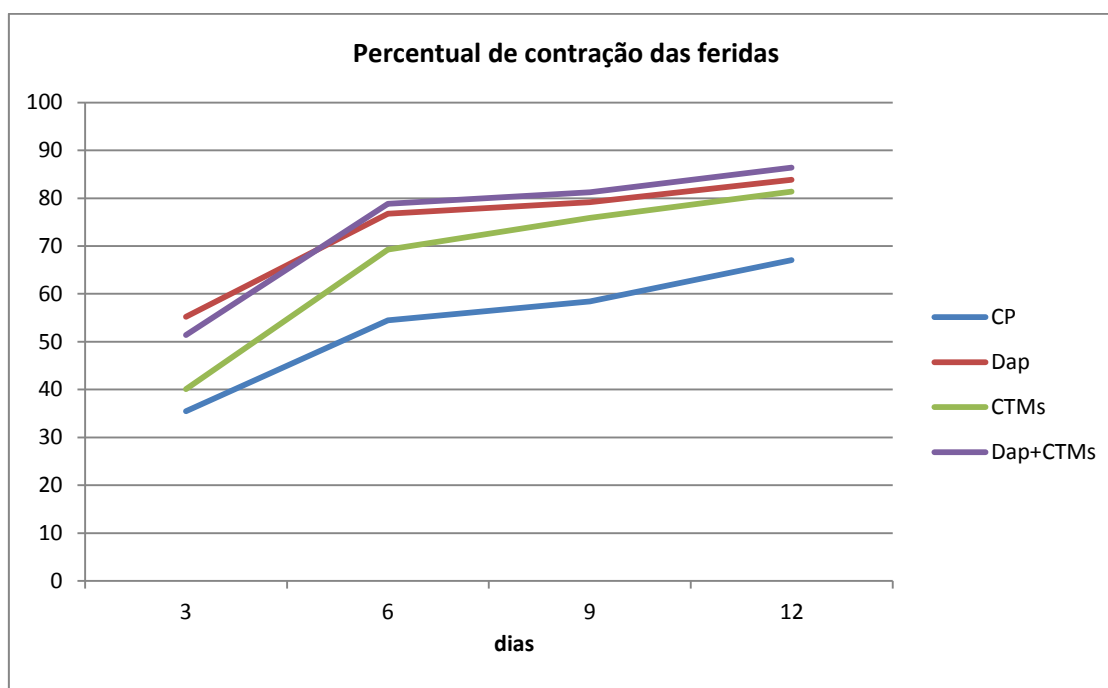


Figura 6- Gráfico de linhas demonstrando a porcentagem de contração das feridas dermonecroticas em coelhos de acordo com o tratamento instituído até o 12º dia após inoculação de 20 µg de veneno de *Loxosceles laeta*. CP= PBS, DAP= Dapsona, CTMs= Células-tronco mesenquimais, DAP+ CTMs= Dapsona+ células-tronco mesenquimais.

4.7. Avaliação histopatológica das lesões

Em relação às alterações histopatológicas observadas após coloração com H.E, os animais do controle positivo apresentaram extensas áreas de necrose, intenso infiltrado neutrofílico, hemorragia intradérmica e focos de mineralização, comprovados pela coloração com método de von Kossa (Figura 7) assim como observaram Elston et al. (2000) e Ospedal et al. (2002). Alguns estudos histopatológicos prévios descrevem infiltração eosinofílica precoce (Maynor et al., 1997; Elston et al., 2000). Portanto, neste estudo, a ausência de infiltração eosinofílica pode ser explicada pelo tempo de coleta das amostras histopatológicas (Phillips et al., 1995).

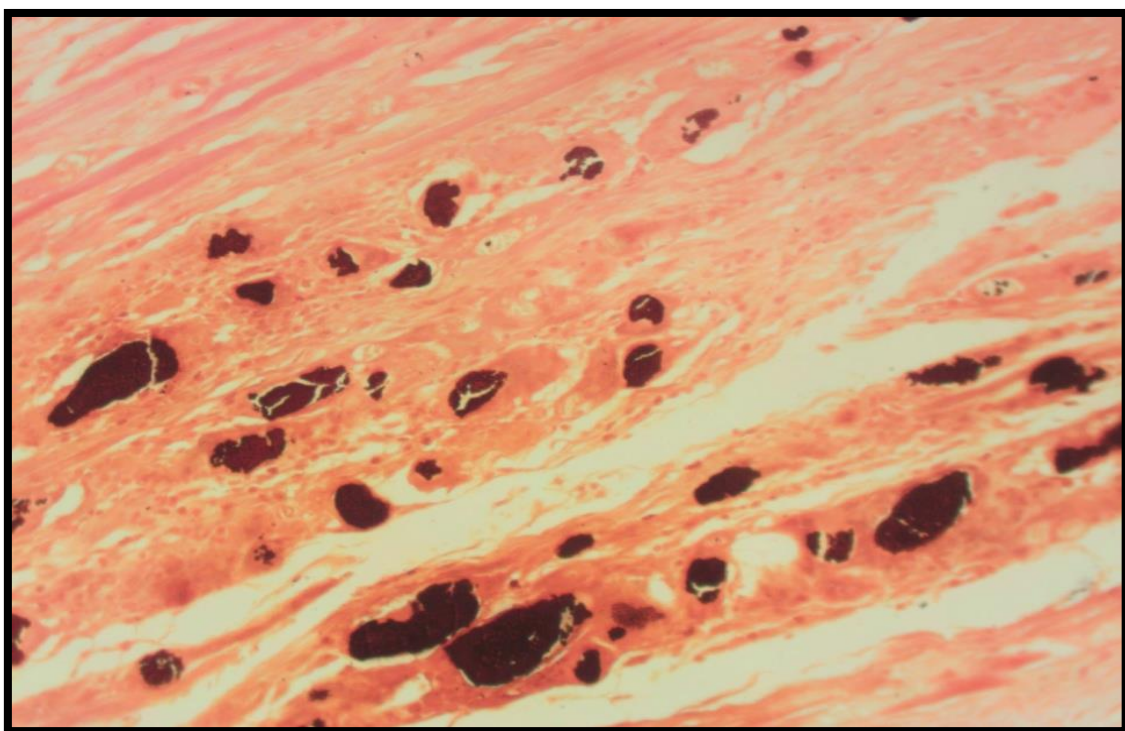


Figura 7: Fotomicroscopia de pele de coelhos inoculados com veneno de *Loxosceles laeta* após coloração especial com von Kossa (100x). Notam-se múltiplos nódulos enegrecidos delimitados na derme de coelhos, evidenciando calcificação tecidual.

Os animais do grupo tratado com dapsona apresentaram lesões menos significativas com áreas de mineralização e angiogênese. Os tratados com as CTMs apresentaram reações similares aos que receberam dapsona. No grupo em que associou-se as CTMs e dapsona foram observadas lesões consideravelmente mais discretas, assim como discreto infiltrado inflamatório (Figura 8).

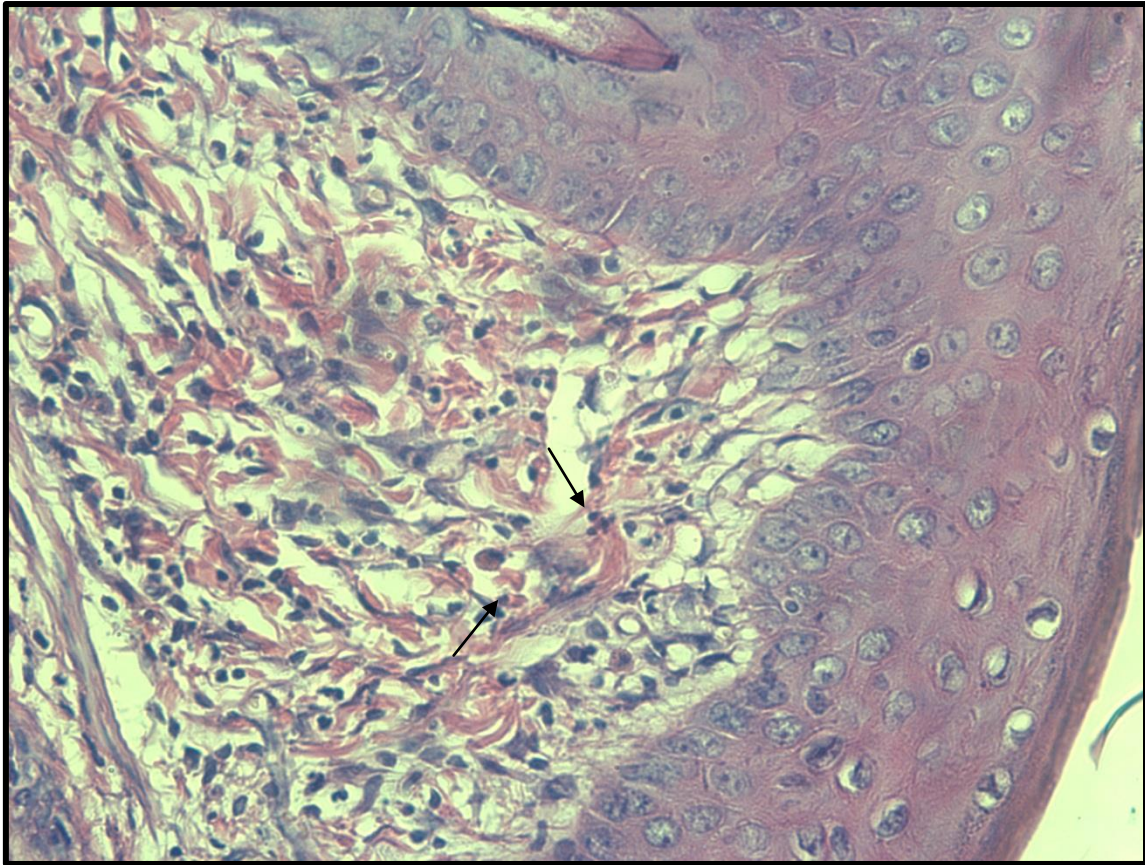


Figura 8- Fotomicroscopia de pele de coelhos Nova Zelândia após inoculação de veneno de *L. laeta* e tratamento com a associação de CTMs e dapsona, corada por hematoxilina e eosina (400x). Observa-se discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear (seta) e discreta hiperqueratose ortoceratótica (canto superior direito).

A invasão neutrofílica tecidual é considerada uma das principais causas da lesão dermonecrótica observadas no loxoscelismo (Smith e Micks, 1970; Silva et al., 2004). Isso pode ser comprovado no grupo CP, em que associado à formação de crostas e dano na epiderme, derme superficial e profunda, observou-se intenso infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico (Figura 9). Em contraste, nos grupos em que as lesões foram menos evidentes, infiltrações neutrofílicas discretas foram observadas, como ocorreu no grupo que recebeu tratamento com a associação de dapsona e CTMs. Isso pode ser explicado pelo efeito antiagregador leucocitário da dapsona, já descrito por alguns autores (Rees et al., 1985; Booth et al., 1992; Barret et al., 1994; Hogan et al., 2004), bem como pelo efeito imunomodulador das CTMs, que atenuam a inflamação e reprogramam o sistema imune local favorecendo a reparação tecidual e inibindo a formação de tecido fibrótico exuberante (Nauta e Fibbe, 2007; Jackson et al., 2012).

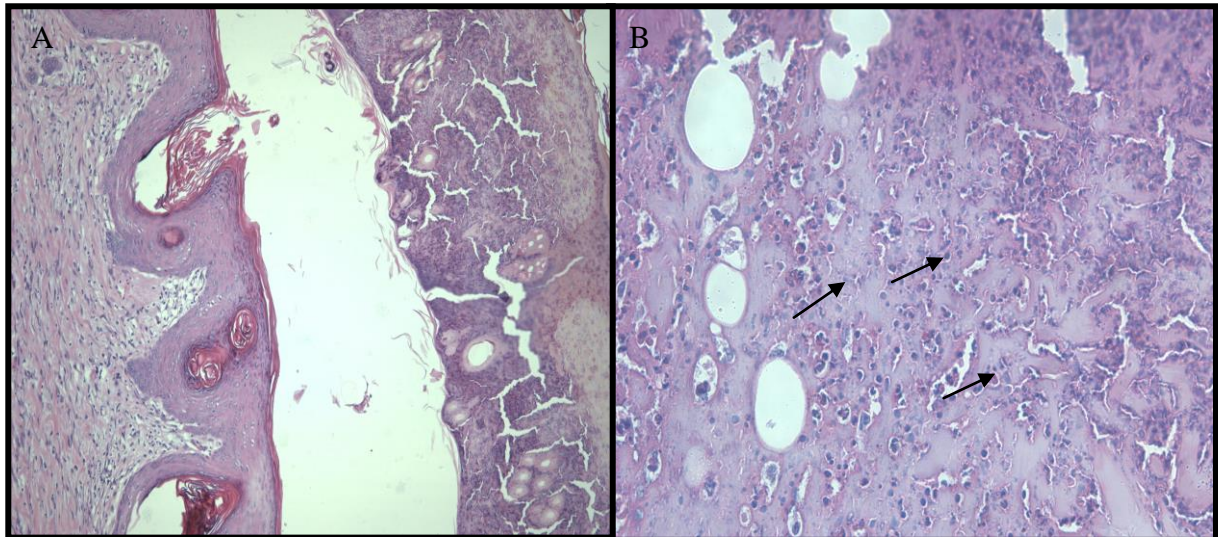


Figura 9- Fotomicroscopia da pele de coelhos em que foram aplicados 20 μ g do veneno e tratados com PBS, após coloração com hematoxilina e eosina (400x). A) Presença de crosta fibrinonecrótica (canto direito) e descontinuidade da epiderme. B) Presença de intenso infiltrado inflamatório neutrofílico (setas).

As observações realizadas nos grupos que receberam CTMs provavelmente ocorreram devido ao estímulo positivo sobre as células locais, como queratinócitos e células progenitoras (Harman, 2013). As CTMs tem a capacidade de interagir com o microambiente local, atrair células progenitoras, diferenciar em outros tecidos e produzir uma série de fatores solúveis, como citocinas e fatores de crescimento que influenciam positivamente na cicatrização de feridas crônicas como as observadas no loxoscelismo cutâneo (Hocking e Gibran, 2010; Harman, 2013). Além disso, as CTMs tem um efeito imunomodulador na inflamação local da pele, sugerindo que ela pode ser aplicada em pacientes com feridas de difícil cicatrização (Kim et al., 2013)

4.7.1. Avaliação das fibras colágenas

Para a avaliação das fibras colágenas, optou-se por realizar dois métodos diferentes: identificação do colágeno total pela coloração de tricrômico de Masson, e identificação e quantificação dos colágenos maduros e imaturos pela coloração de Picro-sirius Red. A quantificação e diferenciação do colágeno tornam-se importantes para avaliar o estágio de cicatrização, já que na evolução desse processo, observa-se organização colagênica, assim como substituição gradual do colágeno imaturo pelo maduro (Reinke e Sorg, 2012).

Os animais submetidos ao tratamento com dapsona e associação de dapsona e CTMs demonstraram uma quantidade maior de fibras colágenas totais do que os outros grupos ($p>0,05$) (Tabela 15). Esse aumento foi proporcionado pelo aumento no colágeno do tipo I, que representa colágeno maduro, porém sem diferença ($p>0,05$) em relação aos grupos que receberam outros tipos de tratamentos (Tabela 16). Nesses animais as CTMs podem ter induzido ou estimulado a diferenciação de células envolvidas no processo de reepitelização, como os fibroblastos, aumentando a deposição de colágeno no sítio lesional (Figura 11), assim como demonstraram Neto et al. (2012). Além disso, as CTMs promovem angiogênese e estabilidade vascular, condições extremamente importantes para nutrição adequada dos fibroblastos e conseqüentemente produção adequada da matriz extracelular e tecido de granulação (Jackson et al., 2012). A quantidade maior de colágeno tipo I observada em todos os grupos é esperada, já que este representa 87% do colágeno da derme de animais saudáveis. Durante o processo inicial de cicatrização, a razão entre colágeno tipo I e tipo III, diminui para 2:1, em decorrência da produção e deposição de colágeno imaturo na derme (Cha e Falanga, 2007) assim como observado nesse experimento nos grupos em que realizou-se ferida dermonecrótica experimental.

Tabela 15- Médias das áreas ocupadas em *pixels* por colágeno em coelhos Nova Zelândia de acordo com os diferentes tipos de tratamentos instituídos após coloração com tricrômico de Massom em amostras coletadas 12 dias após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*.

Grupos	Colágeno total
Controle negativo	396125,70 ^A
Controle positivo	582954,90 ^{AB}
Dapsona	679998,50 ^{AB}
Células-tronco	590493,40 ^{AB}
Dapsona+células-tronco	742.477,60 ^B

Letras maiúsculas diferentes representam valores estatísticos diferentes nas colunas pelo teste de Tukey em que $p<0,05$.

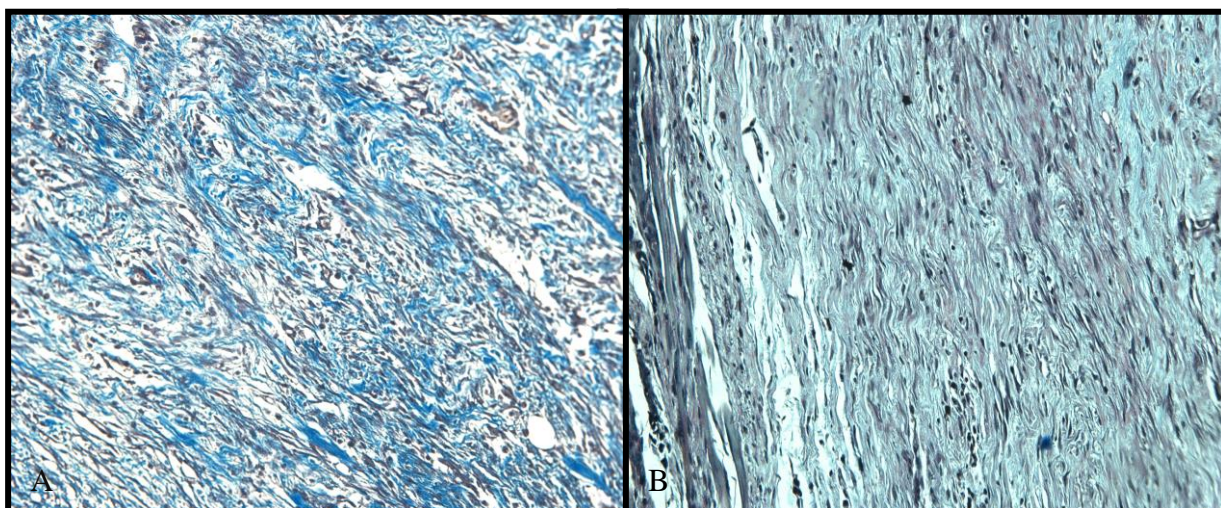


Figura 10- Identificação das fibras colagênicas em coelhos Nova Zelândia pela coloração tricrômico de Massom. A) Animal inoculado com veneno de *L. laeta* e tratado com PBS (CP), em que se observam feixes corados em azul que representam colágeno (200x). B) Animal inoculado com veneno de *L.laeta* e tratado com associação de dapsona e células-tronco mesenquimais (DAP+CTMs), em que se observam feixes de colágeno mais organizados e em maior quantidade (200x).

Tabela 16- Valores médios da área ocupada em *pixels* por colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) em coelhos Nova Zelândia de acordo com os diferentes tipos de tratamentos instituídos em amostras coletadas 12 dias após a inoculação do veneno de *Loxosceles laeta*

Grupos	Colágeno tipo I	Colágeno tipo III	Razão CO I/ CO III
Controle negativo	275.233,50	50.503,73 ^A	5,44
Controle positivo	246.363,16	182.065,60 ^{AB}	1,35
Dapsona	356.885,40	180.533,50 ^{AB}	1,97
Células-tronco	297.216,94	185.910,70 ^{AB}	1,60
Dapsona+células-tronco mesenquimais	356.202,60	263.654,70 ^B	1,35

Letras maiúsculas diferentes representam valores estatísticos diferentes nas colunas pelo teste de Tukey em que $p < 0,05$. Para análise de variância dos dados referentes ao colágeno tipo I, realizou-se transformação (Log10). CO I= colágeno tipo I; CO III= colágeno tipo III.

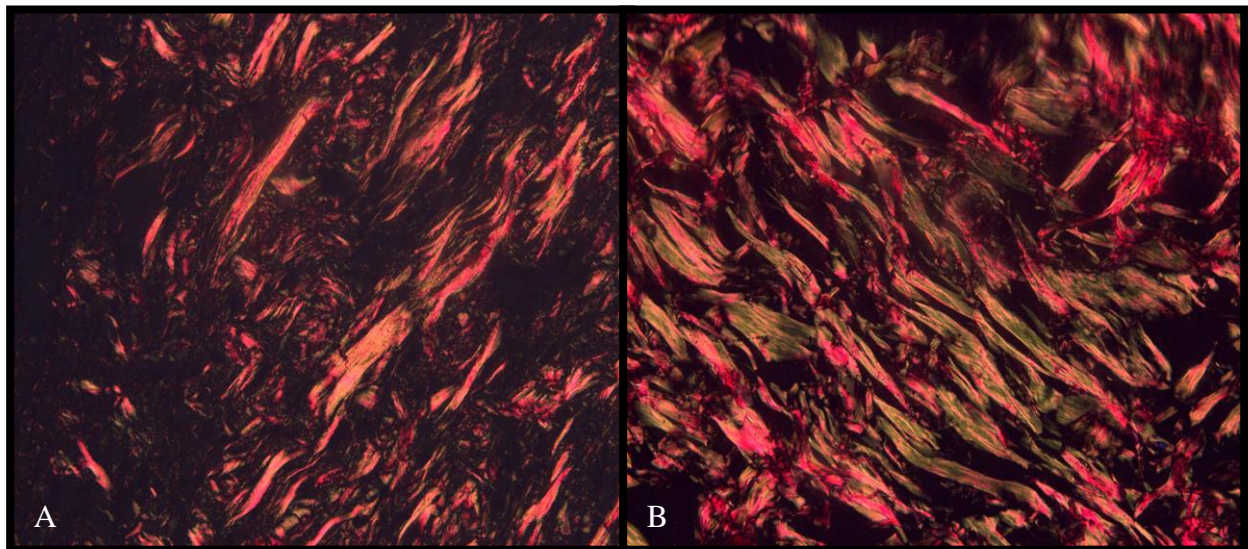


Figura 11- Identificação das fibras colágenas tipo I (vermelha) e tipo III (verde) pela técnica de Picro-sirius Red na pele de coelhos, doze dias após inoculação experimental com veneno de *Loxosceles laeta*. A) Animal do grupo controle positivo, em que se nota predomínio absoluto de fibras colágenas marcadas em vermelho, que representam as fibras colágenas maduras, do tipo I (aumento de 400X). B) Animal do grupo tratado com a associação de dapsona e células-tronco, em que se observa uma organização maior das fibras colágenas e presença de fibras colágenas imaturas, do tipo III, marcadas por uma coloração esverdeada (aumento de 400X).

5. CONCLUSÕES

A dose de 20 μg de veneno de *L. laeta* foi capaz de induzir lesão dermonecrótica em coelhos. Comprova-se que os coelhos são excelente modelo experimental para avaliação de tratamentos em feridas dermonecróticas ocasionadas pelo loxoscelismo, já que a inoculação intradérmica desse veneno é capaz de produzir lesões dermonecróticas muito similares às observadas em acidentes naturais em humanos.

Os resultados hematológicos e bioquímicos não demonstraram alterações compatíveis com loxoscelismo sistêmico, embora algumas variações tenham ocorrido. Porém nenhuma das alterações observadas pode ser relacionada ao tipo de tratamento realizado, contudo, as terapias associadas ou em monoterapia não produziram efeitos colaterais sistêmicos, o que fornece uma maior segurança na sua utilização para tratamento de feridas dermonecróticas.

As CTMs isoladas e associadas com dapsona proporcionaram recuperação tecidual mais rápida o que sugere que possuem efeito positivo na cicatrização de feridas desse tipo. Além disso, os exames histopatológicos realizados demonstraram menor grau de lesão tecidual, menor intensidade inflamatória e maior deposição de fibras colagênicas quando comparados com o grupo tratado com PBS, indicando um grande potencial na utilização de células-tronco em terapias regenerativas após acidente com a “aranha marrom”.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, R.J; CAMPOLI, J; JOHAR, S.K. et al. Suspected brown recluse envenomation: a case report and review of different treatment modalities. *J. Emerg. Med*, v.41, n.2, p.31-37, 2011.

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

BALBINO, C.A; PEREIRA, L.M; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. Cienc. Farm*, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARBARO, K.C; SOUZA, M.V; MORHY, L; EICKSTEDT, V.R.D; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Protei. Chem*, v.15, n.4, p.337-343, 1996.

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

BARBARO, K.C; LIRA, M.S; ARAUJO, C.A, et al. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon*, v.56, n.6, p. 972-979, 2010.

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

BARRETO FILHO, J.B.; OLIVEIRA, M.S. Placental structure and biological aspects of fetal membranes cultured in vitro. In Luca Ceccherini-Neli, Barbara Matteoli.

(Org).Biomedical tissue culture, 1aed. In Tech Europe In Tech. Croácia: In Tech- Open Access Publisher, v.1, p.115-132, 2012.

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

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

BERTASSOLI, B.M; NETO, A.C.A; OLIVEIRA, F.D. et al. Mesenchymal stem cells- emphasis in adipose tissue. *Braz. Arch. Biol. Technol*, v.56, n.4, p.607-617, 2013.

BOOTH, S.A; MOODY, C.E; DAHL, M.V. et al. Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function. *J. Invest. Dermatol*, v. 98, p.135-40, 1992.

BRYANT, S.M; PITTMAN, L.M. Dapsone use in *Loxosceles reclusa* envenomation: is there an indication? *Am. J. Emerg. Med*, v.21, p.89-90, 2003.

CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol*, v.213, p.341-347, 2007.

CARPENTER, J.W. Exotic Animal Formulary, 4^a ed. Elsevier, 2012, 744p.

CHA, J; FALANGA, V. Stem cells in cutaneous wound healing. *Clin. Dermatol*, v.25, p.73-78, 2007.

CHAIM, O.M; SADE, Y.B; da SILVEIRA. et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces neprotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharm*, v.211, p.64-77, 2006.

COLEMAN, M.D. Dapsone toxicity: some current perspectives. *Gen. Pharmac*, v.26, n.7, p-1461-1467, 1995.

COLLACICO, K; CHANQUETTI, A.M.S; FERRARI, R. Acidente por *loxosceles* em cão – relato de caso. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. v. XII, n. 2, p.179-195, Dezembro, 2008.

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.

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

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

DEL CARLO, R.J; MONTEIRO, B.S; NETO, N.M.A. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. *Revista Ceres*, v.56, n.4, p.446-450, 2009.

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

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

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

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

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. *J. Biol. Chem*, v.271, n.17, p.10188-10193, 1996.

FRANÇA, F.O; BARBARO, K.C; ABDULKADER, R.C. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, v.96, p.287-290, 2002.

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

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

GONÇALVES DE ANDRADE, R.M; LOURENÇO, W.R; TAMBOURGI, D.V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, sicariidae). *J.Arachnol*, v.28, p.245-247, 2000.

GUO, S; DIPIETRO, L.A. Factors Affecting wound healing. *J. Dent. Res*, v.89, n.3, p.219-229, 2010.

HARMAN, R.J. Stem cell therapy in veterinary dermatology. *Vet. Dermatol*, v.24, p.90-e24, 2013.

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

HOGAN, C.J; BARBARO, K.C; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emer. Med*, 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, 2003. Cap. 4, p.66-86.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. *Vet. Clin. N. Am-Small*, v.36, p.667-685, 2006.

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

ISBISTER, G.K; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. *Toxicon*, v.43, p.477-492, 2004.

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

KAMIMURA, H.M; PAIVA, B.S.R; AYRES, J.A. Sistematização da assistência de enfermagem: acidente por *Loxosceles gaucho*. *Rev. Bras. Enferm*, v.62, n.6, p.928-931, 2009.

KANEKO, J. J; HARVEY, J. W; BRUSS, M. L. (Eds). Clinical biochemistry of domestic animals. 5a ed. Academic Press, 2008, 916p.

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

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.

LAU, K; PAUS, R; TIEDE, S. et al. Exploring the role os stem cells in cutaneous wound healing. *Exp.Dermatol*, v.18, p.921-933, 2009.

LIN, G; GARCIA, M; NING, H. et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem. Cells. Develop*, v.17, p.1053-1064, 2008.

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.

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

MACHADO, L.H.A; ANTUNES, M.I.P.P; MAZINI, A.M. et al. Necrotic skin lesion in a dog attributed to *Loxosceles* (Brown Spider) Bite: A Case Report. *J. Venom. Anim. Toxins. incl. Trop. Dis*, v.15, n.3, p.572-581, 2009.

MALAQUE, C.M.S, ORI, M; SANTOS, S.A. et al. Production of TNF- α by primary cultures of human keratinocytes challenged with *Loxosceles gaucho* venom. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.41, n.3, p.179-182, 1999.

MALAQUE, C.M.S., CASTRO-VALENCIA, J.E., CARDOSO, J.L.C. et al. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.44, n.3, p.139-143, 2002.

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

MARTINS, P.D.E; UEBEL, C.O; MACHADO, D.C. et al. Adipose tissue mature stem cells in skin healing: a controlled randomized study. *Rev. Bras. Cir. Plast*, 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. *Acad. Emerg. Med*, v.4, n.3, p.184-192, 1997.

MELO, M.M; SILVA JUNIOR, P.G.P; JUNIOR, D.V. et al. Aracnismo. *Cad.Téc.Vet.Zootec*, n.44, p.98-107, 2004.

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

MINGUEL, J.J; ERICES, A; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med*, v.226, p.507-520, 2001.

MIURA, M; GRONTHOS, S; ZHAO, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.100, n.10, p.5807-5812, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B.R.A.S.I.L. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde – Fundação Nacional de Saúde, 2001. p.45-56.

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. *Biochem. Bioph. Res. Co*, v. 342, p. 323–329, 2006

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

NETO, N.M.A; DEL CARLO, R.J; MONTEIRO, B.S. et al. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. *Clin. Exp. Dermatol*, v.37, p.544-553, 2012.

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. *Int. J. Exp. Pathol*, v.84, p. 287–294, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

PLATNICK, N.I., 2013. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History. Disponível em:
<<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em 08/09/2013.

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

REINKE, J.M; SORG, H. Wound repair and regeneration. *Eur. Surg. Res*, v.49, p.35-43, 2012.

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. *J. Am. Acad. Dermatol*, v.44, p.561-576, 2001.

SANDIDGE J.S. Arachnology: scavenging by brown recluse spiders. *Nature*, v. 30, p. 426-430, 2003.

SASAKI, M; ABE, R; FUJITA, Y. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol*, v.180, p. 2581-2587, 2008.

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

SILVA, 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.

- SILVA, D.G.K.C; TEODORO, G.M; SENA, L.V. et al. Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no hospital de pediatria-Hosped/UFRN da cidade de Natal-RN. *RBAC*, v.37, n.4, p.239-242, 2005.
- SILVESTRE, F.G; CASTRO, C.S; MOURA, J.F. 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. Engl. J. Med*, 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. *Lab.Invest*, v.22, p.90-93, 1970.
- SUNDERKOTTER, C; SEELIGER, S; SCHONLAU, F. et al. Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. *Exp. Dermatol*, v.10, p.391-404, 2001.
- SWANSON, D.L; VETTER, R.S. Loxoscelism. *Clin. Dermatol*, 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; SOUZA-E-SILVA, M.C.C; SANTORO, M.L; BARBARO, K.C; REBECCHI, I.M.M; SANO-MARTINS, I.S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Hum. Exp. Toxicol*, v.23, n.10, p.477-486, 2004.
- XIAOBING, F; LIJUN, F; XIAOKUN, L. et al. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injuries. *Wound. Rep. Reg*, v.14, p.325-335, 2006.
- WENDELL, R.P. Brown recluse spiders: a review to help guide physicians in nonendemic areas. *South. Med. J*, v. 96, n.5, 486-490, 2003.
- WOLF, R; TUZUN, B; TUZUN, Y. Dapsone: unapproved uses or indications. *Clin. Dermatol*, v.18, p.37-53, 2000.

ZHAO, S; WEHNER, R; BORNHAUSER, M. et al. Immunomodulatory properties of Mesenchymal Stromal Cells and Their Therapeutic Consequences for Immune-Mediated Disorders. *Stem. Cells. Develop*, v.19, n.5, p.607-614, 2010.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 83 / 2013, relativo ao projeto intitulado “EFEITOS DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA REPARAÇÃO TECIDUAL DE COELHOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE COM VENENO DE LOXOSCELES”, que tem como responsável MARILIA MARTINS MELO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 04/06/2013. Este certificado espira-se em 04/06/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 83 / 2013, related to the Project entitled “Mesenchymal stem cells effects in tissue repair of experimentally bitten rabbits with Brown Recluse Spider venom”, under the supervision of MARILIA MARTINS MELO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 04/06/2013. This certificate expires in 04/06/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 04/06/2013.