

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MIRIAN PREVELATO DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA ASSOCIADA À TETRACICLINA
NO TRATAMENTO DE LESÕES DE PELE INDUZIDAS PELA PEÇONHA DA
ARANHA-MARROM (*Loxosceles* spp.) EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

LAGES, 2022

MIRIAN PREVELATO DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA ASSOCIADA À TETRACICLINA
NO TRATAMENTO DE LESÕES DE PELE INDUZIDAS PELA PEÇONHA DA
ARANHA-MARROM (*Loxosceles spp.*) EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em
Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da
Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê

Coorientador: Prof. Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim

LAGES, 2022

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Andrade, Mirian Prevelato de

Avaliação do efeito da ozonioterapia associada à tetraciclina no tratamento de lesões de pele induzidas pela peçonha da aranha-marrom (*Loxosceles spp.*) em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Mirian Prevelato de Andrade. -- 2022.

64 p.

Orientador: Joandes Henrique Fontequê

Coorientador: Jean Guilherme Fernandes Joaquim

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2022.

I. Loxoscelismo. 2. Dermonecrose. 3. Ozônio. 4. Tetraciclina. I. Fontequê, Joandes Henrique. II. Joaquim, Jean Guilherme Fernandes. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

MIRIAN PREVELATO DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA OZONIOTERAPIA ASSOCIADA À TETRACICLINA
NO TRATAMENTO DE LESÕES DE PELE INDUZIDAS PELA PEÇONHA DA
ARANHA-MARROM (*Loxosceles spp.*) EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em
Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da
Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Banca examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque

Membros: _____
Profa. Dra. Renata Assis Casagrande

Membros: _____
Profa. Dra. Maria Alcina Martins de Castro

Lages, 28 de julho de 2022

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão, meus avós e meu amado companheiro. Sem eles, eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelas bênçãos concedidas, por guiar os meus passos e iluminar o meu caminho durante esta jornada.

Aos meus pais, Veronica Prevelato e Renato Ribeiro de Andrade, por me presentarem com a dádiva da vida. Ao longo desses anos, vocês se sacrificaram e se dedicaram para que eu tivesse a oportunidade de estudar e ter uma boa formação profissional e pessoal. Mesmo distantes, mantiveram-se ao meu lado, lutando comigo e abraçando todas as minhas escolhas. Portanto, quero agradecê-los por serem os pais mais incríveis, por terem me dado suporte, amor e apoio, mostrando que dificuldades existem para serem superadas. Graças a vocês, estou recebendo o título de Mestre em Ciência Animal.

Ao meu noivo, Andreas Lazaros Chryssafidis, por sempre acreditar no meu potencial, ser o meu porto seguro e exemplo de ser humano e profissional. Agradeço por ser o meu companheiro de todas as horas e por todo o suporte que me foi dado durante o mestrado - desde a elaboração do projeto, auxílio no experimento, até as dúvidas cessadas na realização dessa dissertação. Sem você, nada disso seria possível.

Ao meu irmão, Matheus Prevelato de Andrade, meu amigo e companheiro desde que nasci, por toda ajuda, conselhos e por estar comigo sempre que precisei.

Aos meus avós, Neuza Campana, Ziza Ribeiro, Zeca Prevelato e Vanderlei Andrade, por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos e pelos ensinamentos que levarei para o resto da vida. Vó Neuza, a senhora é a minha segunda mãe, por isso sou eternamente grata por ter cuidado de mim e por ser o exemplo que quero seguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê, que me acolheu de braços abertos no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) e pelos conhecimentos transmitidos durante a minha jornada no mestrado. Ao Prof. Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim, meu coorientador, que mesmo distante se dispôs a nos auxiliar na realização deste trabalho.

Aos queridos amigos que fiz durante o mestrado, em especial ao Eduardo Lux, que foi o meu parceiro desde o início desse ciclo, e à Ellen Lara Miguel, que me auxiliou em todas as etapas do experimento. Agradeço todo esforço e dedicação que tiveram com esse projeto - vocês foram pessoas fundamentais para a concretização dele.

Agradeço também à Emanuelle de Liz Ribeiro, que mesmo não sendo sua área, esteve disposta a ajudar.

À Paula Maciel, amiga que fiz durante a graduação em Londrina e que se tornou minha irmã em Lages. Obrigada pelas risadas, pelo ombro amigo, por toda ajuda durante o mestrado e até pelas dificuldades que passamos juntas. Não importa a distância que nos separa, você estará sempre em meu coração.

À Bárbara Porto, Bianca Bicalho e Júlia Martins, que mesmo distantes se fazem presentes em todas as etapas da minha vida.

Agradeço a todos os Professores que dedicaram seu tempo e sabedoria durante a minha formação, em especial às Professoras Dras. Renata Assis Casagrande e Mere Erika Saito, que contribuíram de forma imprescindível na execução deste trabalho.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Patologia Animal (LAPA) e Patologia Clínica do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UDESC, Thierry Grima de Cristo, Ádson Costa e Denilson Rosalez Soares, agradeço toda dedicação e suporte no processamento das amostras.

Às Professoras Dras. Maria Alcina Martins de Castro e Priscila de Oliveira Moraes, e ao acadêmico Lucas Rosemiro Augusto, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo auxílio na elaboração do projeto e por terem me recebido de portas abertas, cedendo os animais do setor de cunicultura, gaiolas e alimentação para a realização dessa pesquisa.

Ao Instituto Butantan, em especial ao Dr. Douglas Oscar Ceolin Mariano, gostaria de agradecer imensamente a disponibilidade em fornecer a peçonha de *Loxosceles intermedia* para a realização deste trabalho.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), pelo ensino de excelência e qualidade, além de funcionários qualificados sempre dispostos a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço aos animais, que fizeram possível o resultado desse trabalho.

Por fim, agradeço todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste projeto.

“Ainda que não se possa curar, sempre
é possível cuidar.”

Lilian Hennemann-Krause

RESUMO

Acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* induzem lesão dermonecrótica em humanos e animais. O tratamento dessas feridas é complexo, contando com diferentes protocolos terapêuticos, os quais em geral não apresentam resultados satisfatórios, de forma que se faz necessário uma busca contínua por novas terapias e protocolos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação do ozônio medicinal com a pomada de tetraciclina 5% em feridas dermonecróticas causadas pela inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos. Foram utilizados 30 coelhos machos, da raça Nova Zelândia, aleatoriamente distribuídos em seis grupos: controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO₃), tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO₃+pt), tratamento com pomada de tetraciclina isolada (Tpt) e tratamento com óleo ozonizado isolado (Tol). À exceção do grupo CN, que foi submetido apenas à aplicação de PBS, todos os outros grupos foram inoculados com 2,5µg/kg da peçonha de *L. intermedia* na região dorsal, entre as escápulas, e tratados 6h após a inoculação. O tratamento com ozônio subcutâneo e óleo ozonizado foram realizados a cada 24h e o tratamento com pomada de tetraciclina a cada 12h, durante cinco dias. Após este período, foi realizada a eutanásia para necropsia e exame histopatológico de pele e demais órgãos. Amostras sanguíneas foram colhidas antes e após 54h e 126h da inoculação da peçonha para avaliação hematológica e bioquímica. As lesões foram avaliadas a cada 12h com câmera convencional e termográfica, a fim de verificar a evolução de acordo com o tratamento instituído. Não houve diferença no hemograma e bioquímica sérica e na análise histopatológica entre os animais do grupo CP e grupos tratados. A dose de 2,5ug/kg de peçonha induziu lesão dermonecrótica típica, todavia, o padrão das lesões diferiu entre animais do mesmo grupo e de grupos diferentes em relação ao tamanho da ferida, quantidade de tecido dermonecrótico e ao tempo de surgimento de dermonecrose após a inoculação da peçonha, não sendo observada diferença entre os grupos quanto à área das lesões. A termografia foi útil para detectar o processo inflamatório cutâneo após 6h e 18h da inoculação da peçonha, devido ao aumento significativo da temperatura na superfície da pele no local da inoculação. Conclui-se que a dose da peçonha utilizada neste trabalho induziu lesão dermonecrótica em coelhos, sem causar alterações sistêmicas. Esses animais são bons modelos experimentais para o estudo de loxoscelismo cutâneo, pois as feridas se assemelham às observadas em humanos. Nas condições experimentais utilizadas, o ozônio subcutâneo, o óleo ozonizado e a pomada de tetraciclina não afetaram no processo inflamatório e de cicatrização nas lesões dermonecróticas induzidas pela peçonha de *L. intermedia* em coelhos.

Palavras-chave: Loxoscelismo; Dermonecrose; Ozônio; Tetraciclina.

ABSTRACT

Accidents caused by spiders of the genus *Loxosceles* induce dermonecrotic lesions in humans and animals. The treatment of these wounds is complex, with different therapeutic protocols, which in general do not present satisfactory results, so that a continuous search for new therapies and protocols for this type of injury is necessary. The objective of the present study was to evaluate the association of medicinal ozone with 5% tetracycline ointment in dermonecrotic wounds caused by inoculation of *Loxosceles intermedia* venom in rabbits. Thirty male New Zealand rabbits were randomly assigned to six groups: positive control (CP), negative control (CN), subcutaneous O₃ treatment (TO₃), subcutaneous O₃ treatment and tetracycline ointment (TO₃+pt), treatment with isolated tetracycline ointment (Tpt) and treatment with isolated ozonized oil (Tol). With the exception of the CN group, which was submitted only to the application of PBS, all other groups were inoculated with 2.5µg/kg of *L. intermedia* venom in the dorsal region, between the scapulae, and treated 6h after inoculation. Treatment with subcutaneous ozone and ozonated oil were performed every 24h and treatment with tetracycline ointment every 12h for five days. After this period, euthanasia was performed for necropsy and histopathological examination of the skin and other organs. Blood samples were collected before and after 54h and 126h of venom inoculation for hematological and biochemical evaluation. The lesions were evaluated every 12 hours with a conventional and thermographic camera, in order to verify the evolution according to the treatment instituted. There was no difference in the blood count and serum biochemistry and in the histopathological analysis between the animals of the CP group and the treated groups. The dose of 2.5ug/kg of venom induced a typical dermonecrotic lesion in some animals, however, the pattern of lesions differed between animals from the same group and from different groups in relation to the size of the wound, amount of dermonecrotic tissue and the time of emergence of dermonecrosis after inoculation of the venom, and no difference was observed between the groups in terms of the area of the lesions. Thermography was useful to detect the cutaneous inflammatory process after 6h and 18h of venom inoculation, due to the significant increase in skin surface temperature at the inoculation site. It is concluded that the dose of the venom used in this work induced dermonecrotic lesion in rabbits, without causing systemic changes. These animals are good experimental models for the study of cutaneous loxoscelism, as the wounds resemble those seen in humans. Under the experimental conditions used, subcutaneous ozone, ozonated oil and tetracycline ointment did not interfere with the inflammatory and healing process in dermonecrotic lesions induced by *L. intermedia* venom in rabbits.

Keywords: Loxoscelism; Dermonecrosis; Ozone; Tetracycline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Aranha fêmea (à esquerda) e macho (à direita) da espécie *Loxosceles intermedia*. . 22
- Figura 2. Representação da medida “elipse” empregada na análise termográfica dos grupos experimentais para aferição da temperatura na região da inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos. 41
- Figura 3. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo controle positivo (CP).
..... 43
- Figura 4. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com O₃ subcutâneo (TO₃). 44
- Figura 5. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO₃+pt). 44
- Figura 6. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com pomada de tetraciclina (Tpt). 45
- Figura 7. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* no grupo tratado com óleo ozonizado (Tol). 45
- Figura 8. Comparação entre a média da área da lesão (cm²), dos coelhos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, através do teste de ANOVA, com significância de p<0,05. Não foi observada diferença entre os grupos quanto à área das lesões. p=0,486. 46
- Figura 9. Comparação entre os valores da média da temperatura dos coelhos de todos os grupos nos momentos antes da inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* (0h) e após 6h (6hpi), 18h (18hpi), 30h (30hpi), 42h (42hpi), 54h (54hpi), 66h (66hpi), 78h (78hpi), 90h (90hpi), 102h (102hpi) e 114h (114hpi). 47

Figura 10. Imagens termográficas demonstrando a temperatura superficial corporal dos coelhos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, dos grupos controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO₃), tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO₃+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol), nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi, com aumento significativo da temperatura nos momentos 6hpi e 18hpi.48

Figura 11. Fotomicrografia cutânea dos coelhos dos grupos controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO₃), tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO₃+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol). Aumento de 40x.....54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão do número de eritrócitos, volume globular, concentração de hemoglobina, volume globular médio, concentração de hemoglobina globular média, número de plaquetas e concentração de proteína total plasmática antes (0h), 54h (54hpi) e 126h (126hpi) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, utilizando o teste ANOVA RM para análise entre os momentos, com significância de $p < 0,05$ 50
- Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão do número total de leucócitos, heterófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos antes (0h), 54h (54hpi) e 126h (126hpi) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, utilizando o teste ANOVA RM para análise entre os momentos, com significância de $p < 0,05$ 51
- Tabela 3. Valores médios e desvios-padrão da concentração de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e albumina antes (0h), 54h (54hpi) e 126h (126hpi) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, utilizando o teste ANOVA RM para análise entre os momentos, com significância de $p < 0,05$.
..... 52
- Tabela 4. Alterações macroscópicas e histopatológicas observadas na epiderme, derme, hipoderme e musculatura em coelhos dos grupos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, classificadas através de escore (0=Ausente; 1=Leve; 2=Leve a moderado; 3=Moderado; 4=Moderado a acentuado; 5=Acentuado), e comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$ 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanino Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Anticoagulante Ácido Etilenodiaminotetracético
FA	Fosfatase Alcalina
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
GGT	Gama Glutamiltransferase
HE	Hematoxilina e Eosina
HPI	Horas Pós Inoculação
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzida
IP	Índice de Peróxido
IRA	Injúria Renal Aguda
KC	Quimiocina Derivada de Queratinócito (KC)
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MMP	Metaloproteinase de Matriz Extracelular
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
O ₃	Gás Ozônio
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PTP	Proteína Total Plasmática
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SMase D	Esfingomielinase D
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VG	Volume Globular (VG)
VGM	Volume Globular Médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 HIPÓTESES	21
4 REVISÃO DE LITERATURA	22
5 REFERÊNCIAS	28
6 Avaliação da ozonioterapia no tratamento de feridas causadas pela peçonha de <i>Loxosceles intermedia</i> em coelhos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	36
6.1 INTRODUÇÃO	37
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	38
6.2.1 Comitê de Ética	38
6.2.2 Animais experimentais	38
6.2.3 Alojamento dos animais	38
6.2.4 Enriquecimento ambiental.....	38
6.2.5 Peçonha.....	39
6.2.6 Delineamento experimental.....	39
6.2.7 Pomada de tetraciclina.....	40
6.2.8 Ozonioterapia.....	40
6.2.9 Avaliação das lesões.....	40
6.2.10 Termografia	40
6.2.11 Colheita de sangue.....	41
6.2.12 Hemograma	42
6.2.13 Bioquímica sérica	42
6.2.14 Necropsia e análise histológica.....	42
6.2.15 Análise estatística	42
7 RESULTADOS	43
7.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS LESÕES	43
7.2 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA	46
7.4 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA	49
7.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	53
8 DISCUSSÃO	58
9 CONCLUSÃO	62
10 REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles*, conhecidas popularmente como “aranha-marrom”, tem distribuição mundial e são consideradas problema de Saúde Pública no Brasil devido ao grande número de acidentes registrados anualmente (SINAN, 2022), sendo as espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta* consideradas mais importantes do ponto de vista médico (CORDEIRO et al., 2015).

O quadro clínico desencadeado pela picada dessas aranhas é denominado loxoscelismo, que pode ser dividido em cutâneo e cutâneo-visceral ou sistêmico. O loxoscelismo cutâneo causa lesão dermonecrótica no local da picada, enquanto o loxoscelismo sistêmico pode evoluir para coagulação intravascular disseminada, hemólise intravascular e injúria renal aguda, sendo esta última a principal causa associada ao óbito em humanos e animais acidentados (GREMSKI et al., 2014; MACHADO et al., 2009; SOUZA et al., 2008).

O diagnóstico de loxoscelismo é difícil e geralmente presuntivo, baseado principalmente no histórico, achados dos exames físico e laboratorial, e na exclusão de outras afecções. O diagnóstico definitivo é realizado quando a aranha é visualizada no momento da picada e posteriormente identificada, por isso há muita subnotificação pelos profissionais da área da saúde (NGUYEN; PANDEY, 2019).

O único tratamento específico para o loxoscelismo sistêmico é o soro anti-loxoscélico ou antiaracnídico, que tem eficácia aumentada quando administrado nas primeiras horas após a picada, mas não está disponível para uso em animais domésticos (CHAVES-MOREIRA et al., 2017). Diferentes medicamentos e métodos foram propostos para o tratamento de loxoscelismo cutâneo, como analgésicos, vasodilatadores, oxigênio hiperbárico, anti-histamínicos, antibióticos, corticosteroides, dapsona e excisão cirúrgica, mas até o momento nenhum teve eficácia comprovada e há controversas em relação ao uso para o tratamento de dermonecrose (PAULI et al., 2006). Sendo assim, é necessário a busca por técnicas que possam auxiliar no tratamento da lesão dermonecrótica induzida pela peçonha de *Loxosceles*, visando a redução da resposta inflamatória e aceleração do processo de cicatrização.

A ozonioterapia vêm sendo utilizada desde a Primeira Guerra Mundial e vários estudos comprovaram a sua ação antioxidante, anti-inflamatória e de aumento da perfusão tecidual, sendo amplamente utilizada na cicatrização de feridas tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (ZENG; LU, 2018). No conhecimento dos autores e busca em plataformas de pesquisas científicas, este é o primeiro estudo que se propôs a avaliar o uso do ozônio

medicinal como ferramenta terapêutica para lesões dermonecroticas decorrentes da inoculação de *L. intermedia* em coelhos, tendo em vista uso empírico neste tipo de lesão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da ozonioterapia em diferentes formas de aplicação associada ou não à tetraciclina 5% tópica no tratamento de feridas induzidas pela peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Acompanhar a progressão clínica das lesões de pele em coelhos após o tratamento com O₃ perilesional, pomada de tetraciclina 5% e óleo ozonizado;
- b. Analisar o perfil hematológico e bioquímico com amostras de sangue colhidas antes e depois da inoculação da peçonha de *L. intermedia*;
- c. Avaliar histologicamente a morfologia tecidual nas lesões da peçonha de *Loxosceles intermedia* submetidas aos diferentes tratamentos;
- d. Verificar alterações macro e histopatológicas de órgãos sistêmicos.

3 HIPÓTESES

H0: a aplicação do óleo ozonizado, do ozônio subcutâneo e da pomada de tetraciclina 5% em lesões causadas pela inoculação da peçonha de *L. intermedia* em coelhos não gera nenhum efeito;

H1: a aplicação do óleo ozonizado, do ozônio subcutâneo e da pomada de tetraciclina 5% aumenta o sucesso terapêutico das lesões causadas pela inoculação da peçonha de *L. intermedia* em coelhos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Loxoscelismo é a denominação do quadro clínico provocado pela picada da aranha do gênero *Loxosceles*, popularmente conhecida como “aranha-marrom”, por apresentar coloração que varia do marrom claro ao escuro. Essas aranhas têm distribuição mundial e diferentes espécies foram relatadas na América do Norte, América Central, América do Sul, Europa, África, Oriente Médio, Oceania e Ásia. São aranhas de pequeno porte, com tamanho corporal médio entre 8 a 15mm de comprimento e patas alongadas que podem chegar a 30mm (Figura 1). Algumas características específicas auxiliam na sua identificação, como a presença de três pares de pequenos olhos e desenho no cefalotórax semelhante a um violino (SILVA et al., 2004). As aranhas *Loxosceles* spp. são sedentárias, noturnas, não agressivas e possuem maior atividade no verão. No ambiente externo, escondem-se em telhas, madeiras, caixas ou locais com pouca movimentação. Nas casas, costumam abrigar-se dentro dos sapatos, roupas penduradas, roupas de cama e toalhas, por isso a maioria dos acidentes acontecem quando a aranha é comprimida contra o corpo (FUTRELL, 1992; ANDRADE et al., 1999; FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005).

Figura 1. Aranha fêmea (à esquerda) e macho (à direita) da espécie *Loxosceles intermedia*.



Fonte: Silva et al., 2004

Sua peçonha tem como finalidade paralisar e digerir as presas, mas em humanos e animais pode causar sinais clínicos locais e sistêmicos, como dermonecrose, hemólise intravascular, coagulopatia, injúria renal aguda e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS). O loxoscelismo cutâneo, caracterizado pela lesão dermonecrótica, ocorre em cerca de

80% dos acidentados. O loxoscelismo cutâneo-visceral ou sistêmico é a forma mais grave do envenenamento e acomete a minoria dos pacientes, podendo levá-los ao óbito (MÁLAQUE et al., 2002; SILVA et al., 2004; SOUZA et al., 2008).

Loxosceles é considerada a aranha mais peçonhenta do Brasil, sendo grave problema de Saúde Pública no Sul do país (TAMBOURGI et al., 2000; ARAUJO et al., 2003; SOUZA et al., 2008), onde há predominância das espécies *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (FUTRELL, 1992). Em Santa Catarina, nos últimos quatro anos, foram registrados mais de 7.500 acidentes por “aranha-marrom” em humanos (SINAN, 2022). Baseado em sua distribuição geográfica e no alto número de acidentes notificados, essas aranhas são consideradas uma das mais importantes do mundo (WONG; HUGHES; VOORHEES, 1987; SOUZA et al., 2008). O aumento dos casos de loxoscelismo está associado ao desequilíbrio ecológico causado pelo desmatamento, mudança climática e extinção de predadores naturais, permitindo a adaptação das aranhas no ambiente urbano (GREMSKI et al., 2014).

A peçonha de *Loxosceles* é um complexo proteico de baixo peso molecular, variando de 1 a 40 kDa. Essa composição vem sendo estudada há décadas e, até o momento, as principais toxinas descritas foram as esfingomielinasas D (SMase D), proteases, hidrolases, peptidases, colagenases, fosfatases alcalinas, 5-ribonucleotidasas, fosfohidrolases e metaloproteases. Esses componentes induzem reação inflamatória precoce, liberando mediadores pró-inflamatórios endógenos que contribuem para o desenvolvimento do loxoscelismo cutâneo e sistêmico (CHAVES-MOREIRA et al., 2017).

Os mecanismos fisiopatológicos específicos da peçonha são multifatoriais e ainda não estão totalmente esclarecidos, mas sabe-se que a principal substância responsável por causar a lesão dermonecrotica é a SMase D. Essa enzima interage com a membrana celular e desencadeia reações envolvendo componentes do sistema complemento, migração de polimorfonucleares e plaquetas (FUTRELL, 1992; TAMBOURGI et al., 2005). As SMases D atuam principalmente na indução da expressão de metaloproteinase de matriz extracelular (MMP), endopeptidase dependente de zinco que, ao degradar componentes da membrana basal, promove a diapedese de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, resultando em processo inflamatório local intenso com ativação do sistema complemento, agregação plaquetária e consequente necrose por isquemia (FUTRELL, 1992; TAMBOURGI et al., 2005).

Queratinócitos cultivados expostos à SMase D de *L. laeta* aumentaram a expressão e secreção de metaloproteinases de matriz extracelular, como MMP-2, MMP-7 e MMP-9, que foram associados a morte celular. Isso indica que os queratinócitos são uma possível fonte de MMP, contribuindo para o surgimento das lesões cutâneas (CORREA et al., 2016). Ainda,

concentrações de baixa toxicidade da peçonha de *L. laeta* aumentaram os níveis de superóxido intracelular, causando danos no DNA em queratinócitos humanos (SILVA et al., 2020).

As SMases D, quando adicionadas em cultura de fibroblasto humano, hidrolisaram as esfingomielinas presentes na membrana celular, transformando-as em ceramida-1-fosfato. Esse esfingolipídeo é responsável pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que tem papel fundamental na indução da expressão gênica pró-inflamatória. Além disso, a SMase D pode induzir aumento na concentração do fator de necrose tumoral (TNF- α) (DESAI et al., 1999; DRAGULEV et al., 2007).

O NF- κ B é um fator de transcrição localizado no citoplasma e sua ativação é induzida por inúmeros agentes, como citocinas, radicais livres, endotoxinas, fumaça de cigarro, vírus e bactérias. Depois de ativado, o NF- κ B é transferido para o núcleo, onde regula a expressão de centenas de genes, incluindo enzimas (iNOS e COX-2), citocinas (TNF e interleucinas) e quimiocinas (SERASANAMBATI; CHILAKAPATI, 2016). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua em processos fisiológicos e patológicos, sendo produzido principalmente por macrófagos. É responsável por causar necrose de células tumorais e apoptose, além de ser um mediador chave das reações inflamatórias sistêmicas agudas e crônicas, estimulando a produção de outras citocinas e quimiocinas (CHU, 2013).

Em camundongos, a inoculação da peçonha de *Loxosceles* estimulou a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e quimiocina derivada de queratinócito (KC); mediadores lipídicos, como a prostaglandina E₂ (PGE₂) e recrutamento de leucócitos que contribuem para a reação local induzida pela peçonha (BARBARO et al., 2010). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida no início da inflamação que promove maturação e ativação de neutrófilos e macrófagos (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). A MCP-1 é uma quimiocina que regula a migração de monócitos/macrófagos em respostas inflamatórias (DESHMANE et al., 2009). Como o próprio nome diz, as KC são citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias produzidas pelos queratinócitos (ASAHINA; MAEDA, 2016). Já as PGE₂ são mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico por meio das enzimas COX e induzem dor, febre e vasodilatação (FLOWER, 2003).

Alterações histológicas das lesões cutâneas em animais experimentais e humanos picados por *Loxosceles* incluem espessamento e degeneração endotelial, edema, vasodilatação, dissociação das fibras colágenas na derme, hemorragia subcutânea e intradérmica (TAMBOURGI; GONÇALVES-DE-ANDRADE; BERG, 2010). Análises de biópsia renal mostraram que a peçonha de *L. intermedia* em camundongos induziu padrão complexo de

nefrototoxicidade, caracterizado por edema intersticial, colapso glomerular, deposição de eosinófilos no lúmen dos túbulos, hialinização dos túbulos proximais e distais e eritrócitos nos espaços de Bowman (LUCIANO et al., 2004).

A picada da “aranha-marrom” é indolor e o paciente geralmente apresenta dor entre duas e oito horas após o acidente. Nas seis primeiras horas, há prurido, eritema, edema e áreas de hemorragia, sendo nesse período que o paciente geralmente procura atendimento médico. Entre 12 e 24 horas, forma-se uma bolha cercada por um halo de tecido isquêmico e a evolução para uma ferida dermonecrótica pode ocorrer em até uma semana. Após cinco a sete dias, a lesão necrótica atinge a área máxima e desenvolve uma crosta seca que pode se desprender, formando uma úlcera de difícil cicatrização (CACY; MOLD, 1999; SILVA et al., 2004; DELASOTTA et al., 2014). Apesar da gravidade da ferida, o desenvolvimento de infecções secundárias é raro. Em animais, a evolução clínica da lesão ocorre da mesma maneira e, devido à demora da manifestação da dor, a pronta identificação destes acidentes é difícil (MACHADO et al., 2009; PACE; VETTER, 2009). Os casos graves, caracterizados por loxoscelismo sistêmico, causam sinais clínicos como hematúria, hemoglobinúria, icterícia, febre, náusea e coagulação intravascular disseminada. O diagnóstico do loxoscelismo costuma ser presuntivo e baseado nas características clínicas e epidemiológicas apresentadas pelo paciente no momento da admissão hospitalar, que geralmente ocorre de 12 a 24 h após a picada, quando o dano cutâneo é mais proeminente (GREMSKI et al., 2014).

Devido a compreensão limitada do mecanismo de ação da peçonha de *Loxosceles*, ainda há controvérsia em relação ao tratamento das feridas dermonecróticas (SOUZA et al., 2008). Em geral, o protocolo terapêutico baseia-se no uso de antibióticos, anti-histamínicos, anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais, analgésicos, oxigênio hiperbárico, dapsona, compressas frias e soro antiloxoscélico ou antiaracnídico, sendo que o soro não está disponível para uso em animais domésticos. Em casos mais graves, a hospitalização pode ser necessária para o tratamento de suporte e outras terapias podem ser incluídas, como transfusão sanguínea, diálise, desbridamento cirúrgico e enxerto de pele (REVUZ et al., 2009; LOPES et al., 2020). Apesar de serem comumente utilizados, os corticoides não são eficazes para o controle da dermonecrose e alguns autores sugerem que seu uso seja restrito em casos de loxoscelismo sistêmico. Além disso, o soro antiloxoscélico e antiaracnídico também não se mostraram eficientes para o tratamento de loxoscelismo local, mas isso pode ser atribuído ao atraso na busca de atendimento médico (LOPES et al., 2020).

A descoberta do envolvimento das MMPs na dermonecrose induzida pela peçonha de *Loxosceles* tem grande importância terapêutica, dada a disponibilidade de medicamentos

inibidores dessas enzimas, como as tetraciclinas (TAMBOURGI et al., 2005). Pesquisadores do Instituto Butantan demonstraram que a aplicação tópica de pomada de tetraciclina 5% reduziu o desenvolvimento das lesões dermonecroticas, sugerindo que essa formulação pode ser uma opção terapêutica segura para animais e humanos (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2007).

Tanto na medicina humana como na medicina veterinária, diversas enfermidades vêm sendo tratadas com o uso da aplicação do gás ozônio (O₃) o qual auxilia na oxigenação tecidual e redução da inflamação (CARDOSO et al., 2010; ROSUL; PATSKAN, 2016; SCIORSCI et al., 2020). Apesar de seus benefícios, seu mecanismo de ação é complexo e há poucos estudos com lesões específicas, como acidentes com animais peçonhentos e seus efeitos em toxinas biológicas. Apesar da carência de estudos específicos, o O₃ medicinal tem sido usado empiricamente há décadas em lesões dermatológicas de diversas causas (SOARES et al., 2019).

O O₃ é um gás instável que se transforma rapidamente em oxigênio, podendo induzir efeitos biológicos positivos de longa duração por meio de uma cascata de eventos moleculares que atuam em diferentes componentes celulares e vias metabólicas (COSTANZO et al., 2015). A ozonioterapia foi realizada pela primeira vez durante a Primeira Guerra Mundial, no tratamento de gangrena gasosa dos soldados alemães, devido ao seu forte efeito bactericida sobre *Clostridium* (ZENG; LU, 2018).

No organismo, o O₃ inicialmente induz um estresse oxidativo transitório ao interagir com lipídios da membrana citoplasmática celular, sendo que essa interação induz a produção endógena de antioxidantes, melhorando a perfusão local e a oxigenação dos tecidos, reduzindo respostas inflamatórias (LEÓN et al., 1998; VALACCHI; BOCCI, 2000; AL-DALAIN et al., 2001; ZENG; LU, 2018). Em ensaio *in vitro*, o tratamento com O₃ na concentração de 10µg/mL em células HeLa induziu respostas celulares positivas na organização do citoesqueleto, na ativação mitocondrial e na transcrição nuclear (COSTANZO et al., 2015).

O O₃ administrado por insuflação retal preservou a integridade hepática de ratos da linhagem Sprague-Dawley após injeção intraperitoneal de tetracloreto de carbono, uma substância hepatotóxica por intermédio de radicais livres, provavelmente devido ao aumento na concentração de dois importantes antioxidantes, a superóxido dismutase e a glutatona, além de diminuir a peroxidação lipídica, preparando o organismo para as injúrias mediadas e induzidas por espécies reativas de oxigênio (ROS) (LEÓN et al., 1998).

Em pacientes com hérnia de disco e conseqüente estresse oxidativo, a injeção de O₃ no músculo paravertebral regulou as ROS, diminuiu a superexpressão da atividade de NF-κB e TNF-α, interrompendo a progressão do dano oxidativo e melhorando o desfecho clínico dos

pacientes (FERNÁNDEZ et al., 2013). Em feridas induzidas por *punch* dermatológico em ratos, a injeção subcutânea de O₃ acelerou e melhorou a cicatrização das lesões devido à superexpressão do Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (FGF-2), proliferação miofibroblástica e maior neovascularização (SOARES et al., 2019). Em úlceras do pé diabético, o uso da ozonioterapia associada ao tratamento convencional reduziu o tempo de internação, de recuperação e os gastos do paciente (ROSUL; PATSKAN, 2016), concluindo-se que o O₃ medicinal tem efeito positivo na cicatrização das feridas isquêmicas.

Além desses resultados, o O₃ pode inativar microrganismos por contato direto através de ação oxidativa na parede celular composta por fosfolípidios e lipoproteínas. Desta forma, o mesmo pode atuar no controle de infecções secundárias em casos de feridas necrosadas (ELVIS; EKTA, 2011; SMITH et al., 2017).

O tratamento definitivo para lesões dermonecroticas decorrentes da picada da “aranha-marrom” ainda não foi definido e o soro antiloxoscélico ou antiaracnídico é o único tratamento específico para casos humanos, mas não é totalmente eficiente para impedir os efeitos locais da picada (PAULI et al., 2009). Considerando que o loxoscelismo é um problema de Saúde Pública no Brasil, colocando também a saúde animal em risco, e ainda não há tratamento efetivo para as lesões dermonecroticas, a busca por novas terapias é necessária.

5 REFERÊNCIAS

- AL-DALAIN, S. M. et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 5, p. 391–396, 2001.
- ANDRADE, R. M. G. et al. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 627–632, 1999.
- ANZOLIN, A. P.; BERTOL, C. D. Ozone therapy as an integrating therapeutic in osteoarthritis treatment: a systematic review. **Brazilian Journal of Pain**, v. 1, n. 2, p. 171–175, 2018.
- ARAUJO, S. C. et al. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v. 41, n. 3, p. 261–267, 2003.
- ARIFIN, W. N.; ZAHIRUDDIN, W. M. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 101–105, 2017.
- ASAHINA, R.; MAEDA, S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 17–25, 2016.
- BARBARO, K. C. et al. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 972–979, 2010.
- BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 1, p. 3–11, 2004.
- CACY, J.; MOLD, J. W. The clinical characteristics of brown recluse spider bites treated by family physicians. **Journal of Family Practice**, v. 48, n. 7, p. 536–542, 1999.
- CAMPBELL, T.; ELLIS, C. **Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology**. 3. ed. [s.l.] Blackwell Publishing Professional, 2007.
- CARDOSO, C. C. et al. Ozonoterapia como tratamento adjuvante na ferida de pé diabético. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, p. 442–445, 2010.

CFMV. **Terapias com ozônio e células-tronco são regulamentadas para tratamento de animais.** Disponível em: <[CHARAN, J.; KANTHARIA, N. . How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics** |, v. 4, n. 4, p. 303–306, 2013.](https://www.cfmv.gov.br/terapias-com-ozonio-e-celulas-tronco-sao-regulamentadas-para-tratamento-de-animais/comunicacao/noticias/2020/10/23/#:~:text=Os%20profissionais%20devem%20usar%20o,24%20de%20abril%20de%202020.&text=A%20ozonoterapia%20%C3%A9%20um%20servi%C3%A7o,transforma%20em%20oz%C3%B4nio%20(O3).>.>.</p></div><div data-bbox=)

CHATZAKI, M. et al. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 21–30, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 6, p. 1–12, 2017.

CHU, W.-M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222–225, 2013.

CORDEIRO, F. A. et al. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 24, p. 1–14, 2015.

CORREA, M. A. et al. Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom induces the expression of MMP7 in human keratinocytes: contribution to dermonecrosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016.

CÔRTE, A. C. R. E; HERNANDEZ, A. J. Termografia médica infravermelha aplicada à medicina do esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 4, p. 315–319, 2016.

COSTANZO, M. et al. Low ozone concentrations stimulate cytoskeletal organization, mitochondrial activity and nuclear transcription. **European Journal of Histochemistry**, v. 59, n. 2515, p. 129–136, 2015.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

DAUD, F. V. et al. The use of ozonized oil in the treatment of dermatophytosis caused by

Microsporium canis in rabbits. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 274–281, 2011.

DELASOTTA, L. A. et al. Surgical treatment of a brown recluse spider bite: a case study and literature review. **The Journal of Foot & Ankle Surgery**, v. 53, n. 3, p. 320–323, 2014.

DESAI, A. et al. *Loxosceles deserta* spider venom induces NF- κ B-dependent chemokine production by endothelial cells. **Clinical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 447–456, 1999.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009.

DRAGULEV, B. et al. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* Sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1264–1266, 2007.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 66–70, 2011.

FERNÁNDEZ, O. S. L. et al. Ozone oxidative post-conditioning reduces oxidative protein damage in patients with disc hernia. **Neurological Research**, v. 34, n. 1, p. 59–67, 2013.

FERREIRA, K. D. **Cartilagem auricular de bovinos tratada com solução alcalina: avaliação histológica pré-implantação e termográfica pós-implantação na parede abdominal de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2017.

FERRER, V. P. et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–13, 2013.

FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 756–765, 2005.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 179–191, 2003.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n.

4, p. 261–267, 1992.

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

IZADI, M. et al. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 822–825, 2019.

JUNIOR, R. V. L. et al. *Loxosceles gaucho* Venom-Induced Acute Kidney Injury – In Vivo and In Vitro Studies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. 1–5, 2011.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.

LEÓN, O. S. et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 4, p. 289–294, 1998.

LOPES, P. H. et al. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider envenomation: literature and case review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 7, p. 1461–1477, 2020.

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

MACHADO, L. H. . et al. Necrotic skin lesion in a dog attributed to *Loxosceles* (brown spider) bite: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 572–581, 2009.

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

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. **European Journal of Pharmacology**, v. 523, p. 151–161, 2005.

NGUYEN, N.; PANDEY, M. Loxoscelism: Cutaneous and Hematologic Manifestations.

Advances in Hematology, v. 9, p. 1–6, 2019.

OKAMOTO, C. K. et al. Tetracycline Reduces Kidney Damage Induced by *Loxosceles* Spider Venom. **Toxins**, v. 9, n. 90, p. 1–16, 2017.

OSPEDAL, K. Z. et al. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 287–294, 2002.

PACE, L. B.; VETTER, R. S. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in small animals. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 4, p. 329–336, 2009.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in HaCaT Keratinocytes Apoptosis Induced by *Loxosceles* Venom Sphingomyelinase D. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 1, n. 126, p. 61–68, 2006.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 6, p. 1410–1418, 2007.

PAULI, I. et al. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123–137, 2006.

PAULI, I. et al. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 660–671, 2009.

PEREIRA, N. . et al. Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 3, p. 277–286, 2012.

PIRES, J. R. et al. Effect of systemic ozone therapy as a biomodulator of tissue regeneration and inflammatory response in rats. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 3, p. 1–11, 2021.

REVUZ, J. et al. **Life-Threatening Dermatoses and Emergencies in Dermatology**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2009.

RIBEIRO, M. F. et al. Effects of copaiba oil on dermonecrosis induced by *Loxosceles*

intermedia venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, p. 1–11, 2019.

ROSUL, M. V.; PATSKAN, B. M. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus. **Wiadomości Lekarskie**, v. 69, n. 1, p. 7–9, 2016.

SANGUANINI, R. C. et al. Ozonized solutions favor the repair of experimentally induced skin wounds in rats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 914–921, 2020.

SCIORSI, R. L. et al. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 240–246, 2020.

SERASANAMBATI, M.; CHILAKAPATI, S. R. Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases - A review. **South Indian Journal Of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 368–387, 2016.

SILVA, M. S. DA et al. Cytotoxic and genotoxic effects on human keratinocytes triggered by sphingomyelinase D from *Loxosceles* venom. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 10, p. 3563–3577, 2020.

SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004.

SINAN. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisSC.def>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

SMITH, N. L. et al. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7, n. 3, p. 212–219, 2017.

SOARES, C. D. et al. Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. **Growth Factors**, v. 37, n. 1–2, p. 1–9, 2019.

SONG, M. et al. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, p. 2449–2455, 2018.

SOUZA, A. . et al. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 151–156, 2008.

STRAIN, G. M. et al. Hyperbaric oxygen effects on brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*)

envenomation in rabbits. **Toxicon**, v. 29, n. 8, p. 989–996, 1991.

TAMBOURGI, D. V. et al. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, n. 4, p. 725–731, 2005.

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

TAMBOURGI, D. V; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; BERG, C. W. VAN DEN. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113–1119, 2010.

TARTARI, A. P. S. et al. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. **Inflammation**, v. 43, n. 3, p. 985–993, 2020.

TAVARES, F. L. et al. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 477–486, 2004.

VALACCHI, G.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 11 . Release of factors from human endothelial cells. **Mediators of Inflammation**, v. 9, n. 6, p. 271–276, 2000.

WONG, R. C.; HUGHES, S. E.; VOORHEES, J. J. Spider bites. **Archives of Dermatology**, v. 123, n. 1, p. 98–104, 1987.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International Immunopharmacology**, v. 56, n. 138, p. 235–241, 2018.

6 Avaliação da ozonioterapia no tratamento de feridas causadas pela peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

Resumo

Os acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* spp. constituem importante problema de Saúde Pública no Brasil e a sua peçonha induz dermonecrose no local da picada, podendo causar alterações sistêmicas em casos graves. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do ozônio medicinal associado à pomada de tetraciclina 5% em lesões dermonecróticas induzidas pela peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos. As lesões de pele foram induzidas no dorso de coelhos através da injeção intradérmica de 2,5ug/kg da peçonha de *L. intermedia* e os tratamentos foram instituídos 6h após a inoculação. A pomada de tetraciclina foi aplicada duas vezes ao dia e a ozonioterapia subcutânea e o óleo de girassol ozonizado foram aplicados uma vez ao dia, durante cinco dias. Aspectos clínicos e imagens termográficas foram capturadas a cada 12h e amostras de sangue foram colhidas antes, após 56h e 126h da inoculação da peçonha para realização do hemograma e bioquímica sérica. Foi realizada eutanásia dos animais no 5º dia do experimento para necropsia e análise histopatológica da pele e demais órgãos. A dose utilizada foi suficiente para induzir a lesão dermonecrótica em todos os animais, mas os resultados do hemograma e bioquímica sérica demonstraram que não induziu loxoscelismo sistêmico, pois todos os grupos mantiveram os valores dentro da normalidade para a espécie e sem diferença entre os grupos. Os animais do grupo controle negativo inoculados com PBS estéril não apresentaram nenhuma alteração histopatológica, enquanto os grupos inoculados com a peçonha tiveram lesões na epiderme, derme, hipoderme e musculatura, mas sem diferença entre o controle positivo e os tratamentos. Concluí-se que, o ozônio subcutâneo, o óleo de girassol ozonizado e a pomada de tetraciclina não interferiram no processo inflamatório e de cicatrização nas lesões dermonecróticas induzidas pela peçonha de *L. intermedia*.

Palavras-chave: Loxoscelismo; Dermonecrose; Ozônio; Tetraciclina.

6.1 INTRODUÇÃO

Loxosceles spp. ou “aranha-marrom” é considerada a mais peçonhenta do Brasil, sendo grave problema de Saúde Pública no Sul do país (TAMBOURGI et al., 2000; ARAUJO et al., 2003; SOUZA et al., 2008;), onde há predominância das espécies *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (FUTRELL, 1992). Em Santa Catarina, nos últimos quatro anos, foram registrados mais de 7.500 acidentes por “aranha-marrom” em humanos (SINAN, 2022). Baseado em sua distribuição geográfica e no alto número de acidentes notificados, essas aranhas são consideradas uma das mais importantes do mundo (WONG; HUGHES; VOORHEES, 1987; SOUZA et al., 2008).

A sua peçonha é composta por proteínas de baixo peso molecular e as principais toxinas descritas são as esfingomielinases D, proteases, hidrolases, peptidases, collagenases, fosfatases alcalinas, 5-ribonucleotidasas, fosfohidrolases e metaloproteases. Esses componentes são responsáveis por causar o loxoscelismo cutâneo e cutâneo-visceral através de mecanismos multifatoriais, e a dermonecrose no local da picada ocorre pelo efeito direto do peçonha na membrana celular, membrana basal e matriz extracelular (FUTRELL, 1992). A evolução para o loxoscelismo sistêmico ocorre na minoria dos acidentados e é caracterizado pelo desenvolvimento de hemólise intravascular, icterícia, hemoglobinúria e injúria renal aguda (IRA) (SOUZA et al., 2008).

O tratamento do loxoscelismo cutâneo é controverso devido à má compreensão dos mecanismos de ação da peçonha de *Loxosceles* e à baixa eficácia do soro antiaracnídico e antiloxoscélico para as lesões dermonecroticas. Vários protocolos terapêuticos são utilizados, como oxigênio hiperbárico, anti-histamínicos, corticosteroides, antibióticos, dapsona e excisão cirúrgica da ferida, mas nenhum tratamento é completamente eficaz na redução das lesões cutâneas e na restauração do tecido afetado (RIBEIRO et al., 2019; SILVA et al., 2004; STRAIN et al., 1991). Até o momento, a única formulação com ação comprovada sobre os componentes da peçonha que induzem a dermonecrose é a pomada de tetraciclina 5%, mas ainda está em fase de teste e não é comercializada (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2007).

A ozonioterapia é uma terapia integrativa baseada no uso de uma mistura gasosa de oxigênio e ozônio medicinal. Sua primeira aplicação na medicina foi na Primeira Guerra Mundial para tratar gangrena de soldados alemães feridos (BOCCI, 2004). Por ter baixo custo, apresentar efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, bactericidas, fungicidas, viricidas e de melhora na perfusão tecidual, a sua aplicação dentro da medicina humana e medicina veterinária vem ganhando espaço, sendo a técnica empregada principalmente no tratamento de afecções

dermatológicas, oculares, ortopédicas, infecções virais, fúngicas e bacterianas (ANZOLIN; BERTOL, 2018). No Brasil, a ozonioterapia é reconhecida e regulamentada na medicina veterinária pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária desde 2020 (CFMV, 2020)

Não existem estudos sobre a ozonioterapia como ferramenta terapêutica para o loxoscelismo cutâneo até o presente momento. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos anti-inflamatórios e cicatrizantes da ozonioterapia associada à pomada de tetraciclina 5% na dermonecrose induzida pela peçonha de *L. intermedia* em coelhos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Comitê de Ética

Os protocolos utilizados no presente projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CAV-UDESC, sob protocolo nº 9558151120.

6.2.2 Animais experimentais

Para a execução deste projeto, foram utilizados 30 coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, machos, com peso variando de 2,0 a 3,5kg, seguindo as recomendações internacionais de bem-estar animal e da RN33 de 18 de novembro de 2016 do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

6.2.3 Alojamento dos animais

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, entre 18°C e 22°C, com fornecimento de água e ração comercial *ad libitum*. Ficaram alojados em gaiolas individuais, mas em contato visual e olfativo com os outros coelhos. A sala tinha iluminação controlada, com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro.

6.2.4 Enriquecimento ambiental

A primeira fonte de enriquecimento ambiental foi o contato com os cuidadores. Os animais eram retirados diariamente da gaiola para manuseio, a fim de minimizar o estresse de contenção, que foi realizada pela técnica de charuto com pano limpo. Uma variedade de suplementos alimentares, como cenoura, maçã, verduras e outros vegetais foram servidos diariamente, além da ração comercial.

6.2.5 Peçonha

A peçonha utilizada foi cedida pelo Instituto Butantan e obtida através de eletroestimulação da região esternal de exemplares de *L. intermedia*. A peçonha fornecida era liofilizada e tinha peso de 5mg, sendo diluída em PBS estéril antes da inoculação.

6.2.6 Delineamento experimental

Dada a ausência de dados prévios referentes ao desvio padrão dos resultados dos tratamentos, o cálculo do n amostral foi baseado na equação de recursos ($n=DF/k +1$; sendo n =número de animais, DF =graus de liberdade=20, k =número de grupos), considerando possível perda de 10% (amostra corrigida= $n/1-[\%perda/100]$) (ARIFIN; ZAHIRUDDIN, 2017; CHARAN; KANTHARIA, 2013), em que se obteve o valor de cinco animais por grupo. Os coelhos foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos de cinco animais ($n=5$): controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO₃), tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO₃+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol).

Após tricotomia e antisepsia com clorexidina 0,5%, foram injetadas 2,5µg/kg de peçonha de *L. intermedia* diluído em PBS (tampão fosfato-salino), via intradérmica, no dorso (região interescapular) dos coelhos dos grupos CP, TO₃, TO₃+pt, Tpt e Tol. Os animais do grupo CN foram inoculados via intradérmica com PBS na mesma região. Para a injeção da peçonha e do PBS, os animais foram tranquilizados com acepromazina (1mg/kg, via subcutânea).

Após 6h da inoculação, os animais dos grupos TO₃, TO₃+pt, Tpt e Tol foram tratados. Os tratamentos com O₃ subcutâneo e óleo ozonizado foram realizados a cada 24h e os tratamentos com a pomada de tetraciclina a cada 12h, durante cinco dias. Os animais do grupo CN não receberam tratamento e os animais do grupo CP foram tratados apenas com o veículo (agulha hipodérmica 0,3x13mm) nas quatro bordas da lesão, no tecido subcutâneo, a cada 24h. O experimento foi dividido em três repetições, usando um animal por grupo na primeira repetição e dois animais por grupo nas duas últimas repetições. Todos os animais receberam analgesia com dipirona sódica injetável (25mg/kg) e meperidina (10mg/kg), via subcutânea, a cada 8h, até o final do experimento.

Os coelhos foram monitorados e avaliados quanto aos sinais clínicos e lesões secundárias. Caso fossem detectados sinais clínicos graves, como dispneia ou evolução demasiadamente rápida da lesão, seria realizada a eutanásia, seguindo os protocolos

internacionais de bem-estar animal e legislação do CONCEA (RN33), o que não ocorreu no presente estudo.

Após cinco dias do início do experimento, foi realizada a eutanásia pela associação de anestésico dissociativo (cetamina 30mg/kg) com agonista de adrenorreceptores alfa-2 (xilazina 9mg/kg) e cloreto de potássio (100mg/kg), via intravenosa, seguindo as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA (RN37). Posteriormente, os animais foram submetidos a necropsia e o exame histopatológico e as carcaças foram incineradas em forno crematório do CAV-UDESC.

6.2.7 Pomada de tetraciclina

A pomada de tetraciclina 5% foi obtida em farmácia de manipulação e produzida em veículo de lanolina (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2007). A pomada foi aplicada cobrindo um raio de 2cm do local de inoculação da peçonha.

6.2.8 Ozonioterapia

O gás ozônio foi gerado no aparelho O&L 3.0RM da Ozone&Life. Foram realizadas aplicações de 2mL de O₃ a cada 24h, nas quatro bordas da região perilesional (totalizando 8mL de O₃), na concentração de 15µg/mL. A injeção foi realizada via subcutânea com agulha hipodérmica 0,3x13mm. No grupo Tol, foram realizadas aplicações de óleo de girassol ozonizado com índice de peróxido (IP) entre 600 e 700mEq/Kg, cobrindo um raio de 2cm do local de inoculação da peçonha.

6.2.9 Avaliação das lesões

As lesões foram avaliadas clinicamente e mensuradas a cada 12h, a fim de verificar a evolução de acordo com o tratamento instituído. Registros fotográficos com câmera convencional e câmera termográfica foram realizados a uma distância constante de 1 metro da ferida, e a avaliação clínica foi realizada verificando o formato, condições da pele perilesional e extensão da lesão (comprimento x largura) com paquímetro.

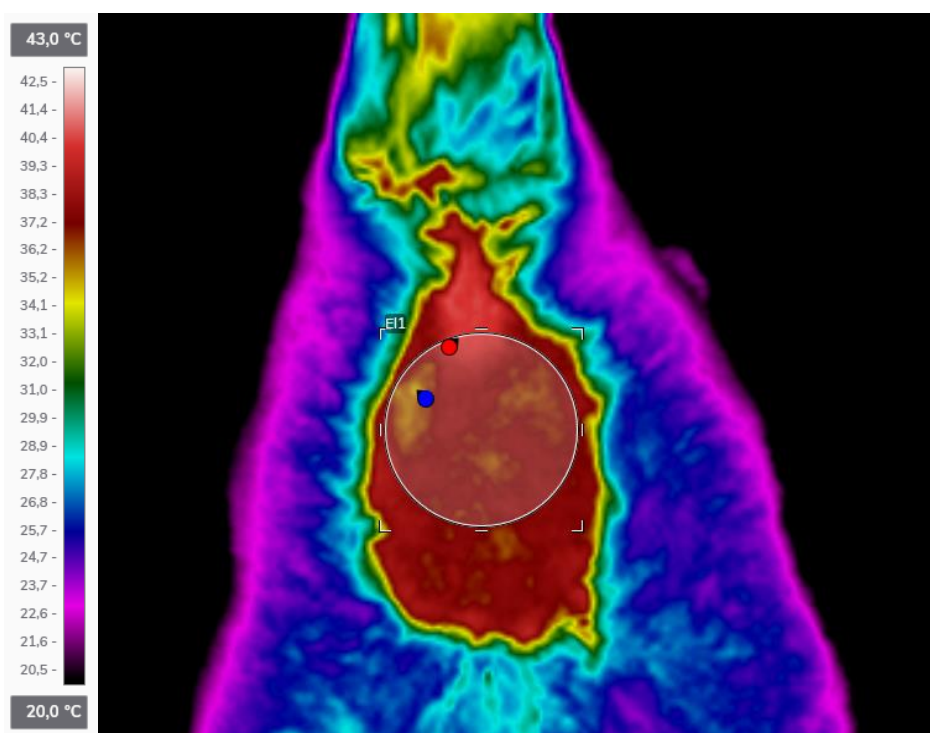
6.2.10 Termografia

A termografia foi realizada com a câmera termográfica Flir E40, com a paleta Rainbow High Contrast, sendo adotado índice de emissividade de 0,88 ($\epsilon = 0,88$) para a projeção das imagens, que foram capturadas antes e após a inoculação da peçonha no dorso dos coelhos, a

cada 12h, em uma distância constante de 1 metro da lesão (FERREIRA, 2017), sendo feita sempre no mesmo horário e em sala com temperatura controlada entre 18°C e 22°C.

Foi utilizado o Software FLIR Thermal Studio® para transferir as imagens ao computador e comparar as temperaturas obtidas entre os grupos. Neste software, foi incluída a medida “elipse” para aferir a temperatura da área da ferida, sendo projetada na forma de um círculo, englobando toda a lesão (Figura 2).

Figura 2. Representação da medida “elipse” empregada na análise termográfica dos grupos experimentais para aferição da temperatura na região da inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos.



Fonte: elaborada pela autora via software FLIR Thermal Studio®.

6.2.11 Colheita de sangue

Amostras sanguíneas foram obtidas pela punção da veia auricular com o auxílio de cateter 24G antes e após 54h e 126h da inoculação da peçonha para análise hematológica e bioquímica, realizada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do HCV-CAV-UDESC. O sangue foi distribuído em microtubos com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para o hemograma e microtubos com ativador de coágulo para análise bioquímica.

6.2.12 Hemograma

O hemograma foi realizado com o contador automático de células (SDH-3 Labtest), que determinou o número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas totais, concentração de hemoglobina, volume globular (VG), volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Esfregaços sanguíneos foram realizados em lâmina de vidro e corados com corante hematológico rápido para contagem diferencial de leucócitos em microscopia óptica de luz.

6.2.13 Bioquímica sérica

As amostras sanguíneas colhidas em microtubos com ativador de coágulo foram centrifugadas à 2.500 g por 10 minutos, para obtenção do soro e mensuração da aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina e albumina por meio de kits comerciais específicos para cada análise em analisador automático Labmax Plenno.

6.2.14 Necropsia e análise histológica

Fragmentos de pele do local de inoculação da peçonha da “aranha-marrom”, bem como fragmentos de músculo esquelético, encéfalo, coração, pulmão, fígado, baço, linfonodo, rins, bexiga, estômago, intestino delgado e grosso foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas. Os órgãos foram clivados, incluídos em blocos de parafina, processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE), para visualização em microscopia óptica.

As lesões dérmicas, epidérmicas, hipodérmicas e musculares, além da intensidade de infiltrado inflamatório no local de inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* foram classificadas através de escore (0=Ausente; 1=Leve; 2=Leve a moderado; 3=Moderado; 4=Moderado a acentuado; 5=Acentuado) e os resultados foram obtidos pelo teste de Kruskal-Wallis.

6.2.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software Jamovi®, versão 2.2.1, e o gráficos foram desenvolvidos através do software GraphPad Prism®, versão 9.2.0. Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Para as variáveis

paramétricas, foi utilizado o ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para identificar diferença entre os grupos, e ANOVA RM para análise entre os momentos. Para as variáveis não paramétricas, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

Não houve diferença entre os grupos tratados e o controle positivo na avaliação clínica e anatomopatológica. Os animais do grupo controle negativo, que não foram inoculados com a peçonha, permaneceram dentro dos parâmetros normais para a espécie durante todo o período experimental e não apresentaram lesões macroscópicas e histopatológicas.

7.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS LESÕES

A dose de 2,5ug/kg da peçonha de *L. intermedia* induziu lesão dermonecrótica típica nos animais, que se iniciou com edema, eritema e hemorragia com halo isquêmico nas primeiras 6h, evoluindo para a formação de tecido necrótico 12h após a inoculação da peçonha (Figura 5). Todavia, neste estudo, o padrão das lesões diferiu entre animais do mesmo grupo e de grupos diferentes em relação ao tamanho da ferida, quantidade de tecido dermonecrótico e ao tempo de surgimento de dermonecrose após a inoculação da peçonha (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7). Apesar da grande variabilidade em relação a apresentação clínica, não foi observada diferença entre os grupos quanto à área das lesões, sendo $p=0,486$ (Figura 8).

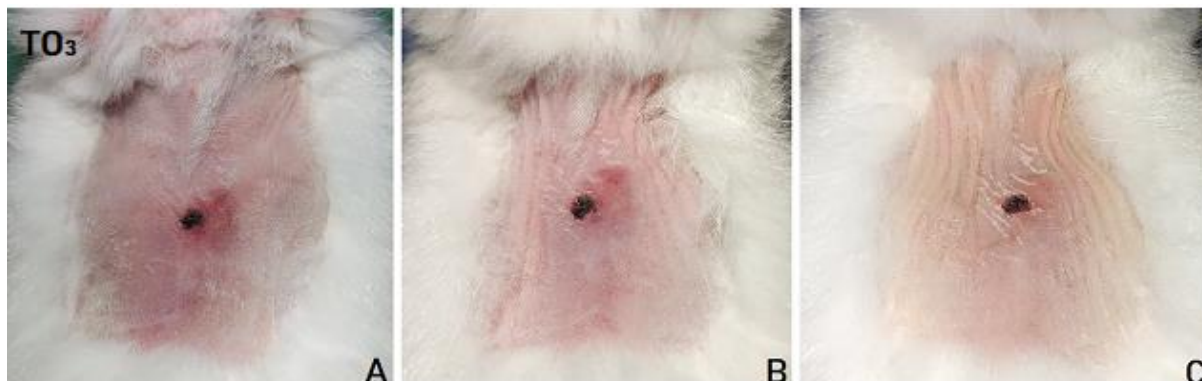
Figura 3. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo controle positivo (CP).



A) Ferida 6h após a inoculação da peçonha, com edema, eritema e hemorragia; **B)** Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose cercada por tecido hemorrágico, 24h após a inoculação da peçonha; **C)** Ferida com área central de necrose no último dia do experimento.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 4. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com O₃ subcutâneo (TO₃).



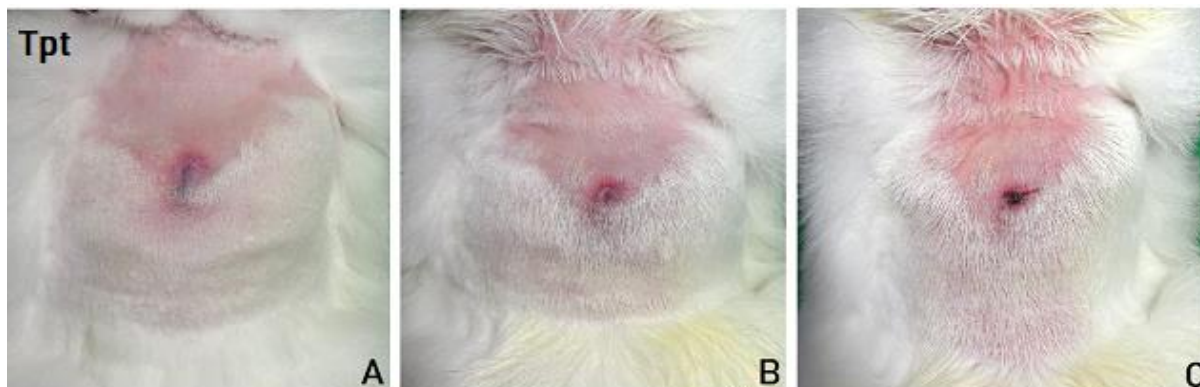
A) Ferida 6h após a inoculação da peçonha, com área central de necrose, cercada por edema, eritema e hemorragia; **B)** Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose cercada por eritema e hemorragia, 24h após a inoculação da peçonha; **C)** Ferida com área central de necrose no último dia do experimento, cercada por eritema. Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 5. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO₃+pt).



A) Ferida 6h após a inoculação da peçonha, com edema, eritema, hemorragia e halo isquêmico evidente; **B)** Ferida dermonecrótica apresentando área central de necrose e halo isquêmico evidente, 24h após a inoculação da peçonha; **C)** Ferida dermonecrótica no último dia do experimento, com área central de necrose cercada por halo isquêmico. Fonte: elaborada pela autora (2022).

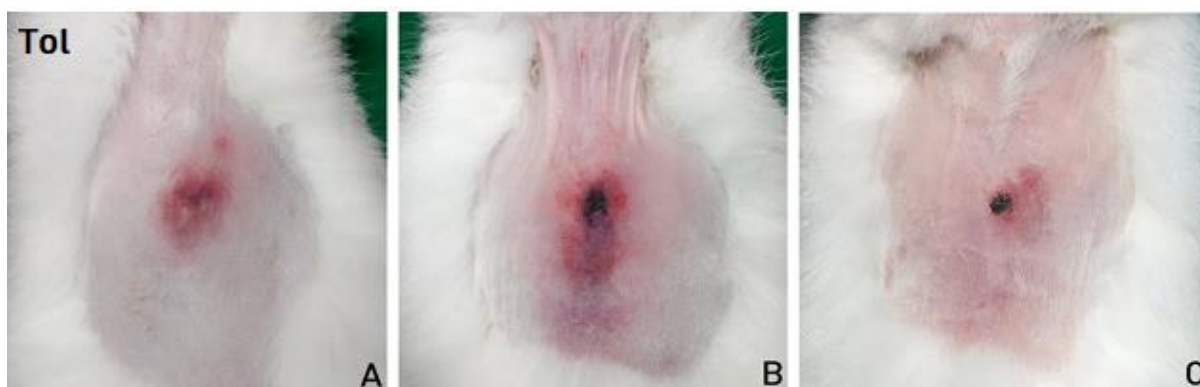
Figura 6. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com pomada de tetraciclina (Tpt).



A) Ferida 6h após a inoculação da peçonha, com edema, eritema, hemorragia e halo isquêmico evidente; **B)** Ferida apresentando edema, eritema, hemorragia e halo isquêmico evidente 24h após a inoculação da peçonha; **C)** Ferida dermonecrótica no último dia do experimento, com área central de necrose.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

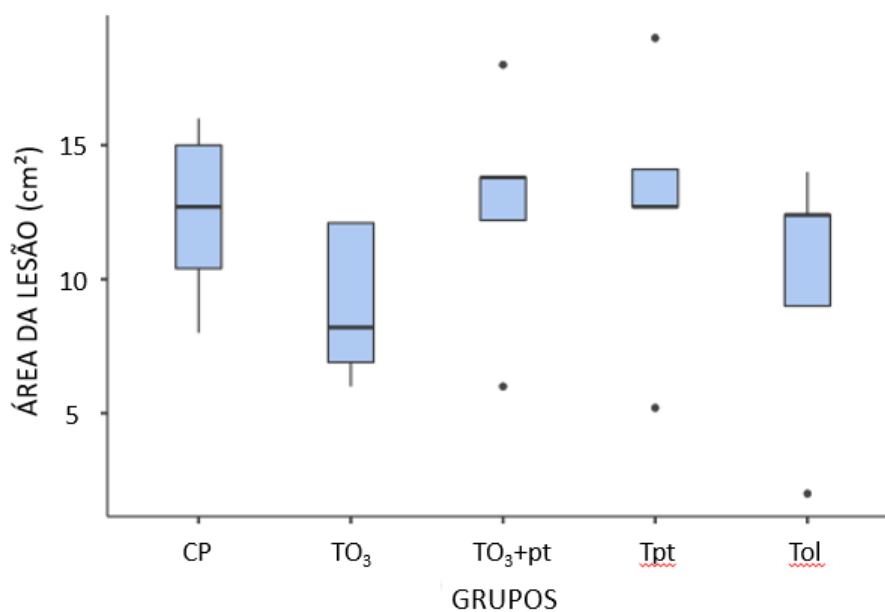
Figura 7. Evolução da ferida dermonecrótica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com óleo ozonizado (Tol).



A) Ferida 6h após a inoculação da peçonha, com edema, eritema, hemorragia e áreas isquêmicas evidentes; **B)** Ferida apresentando edema, eritema, hemorragia e área central de necrose, 24h após a inoculação da peçonha; **C)** Ferida dermonecrótica no último dia do experimento, com área central de necrose, cercada por eritema.

Fonte: elaborada pela autora (2022).

Figura 8. Comparação entre a média da área da lesão (cm²), dos coelhos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, através do teste de ANOVA, com significância de $p < 0,05$. Não foi observada diferença entre os grupos quanto à área das lesões ($p = 0,486$).

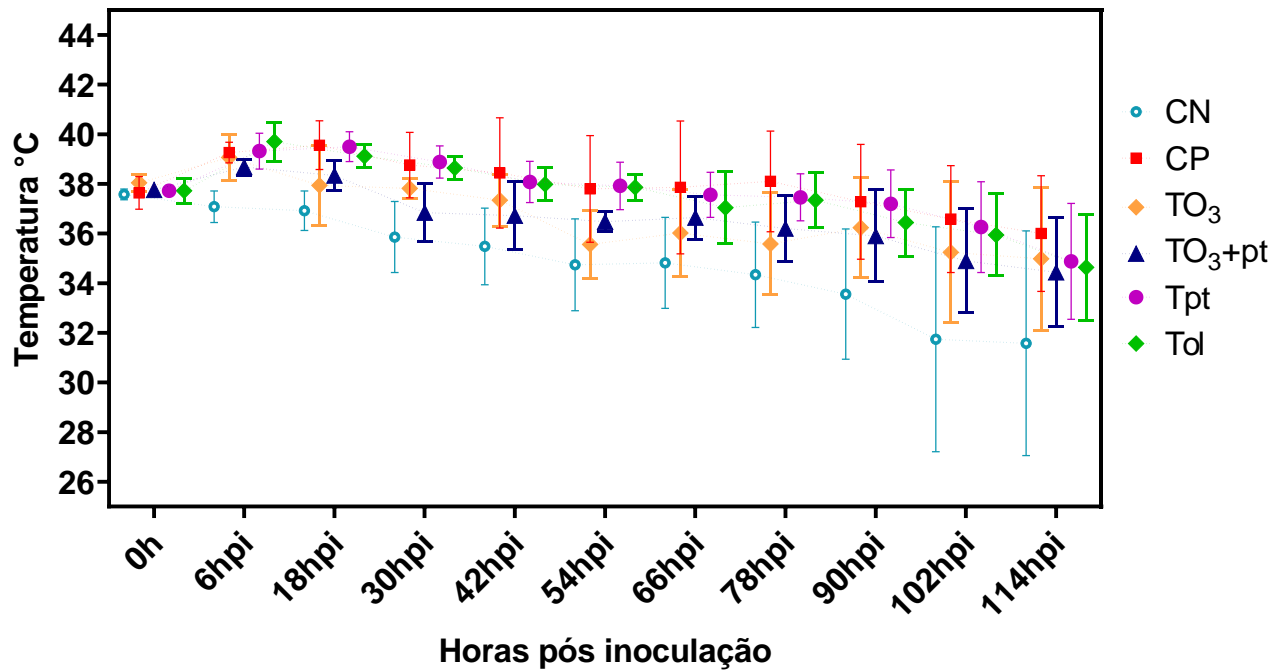


CP= controle positivo; TO₃= tratamento com O₃ subcutâneo; TO₃+pt= tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina; Tpt= tratamento com pomada de tetraciclina; Tol= tratamento com óleo de girassol ozonizado. Fonte: elaborada pela autora (2022).

7.2 AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA

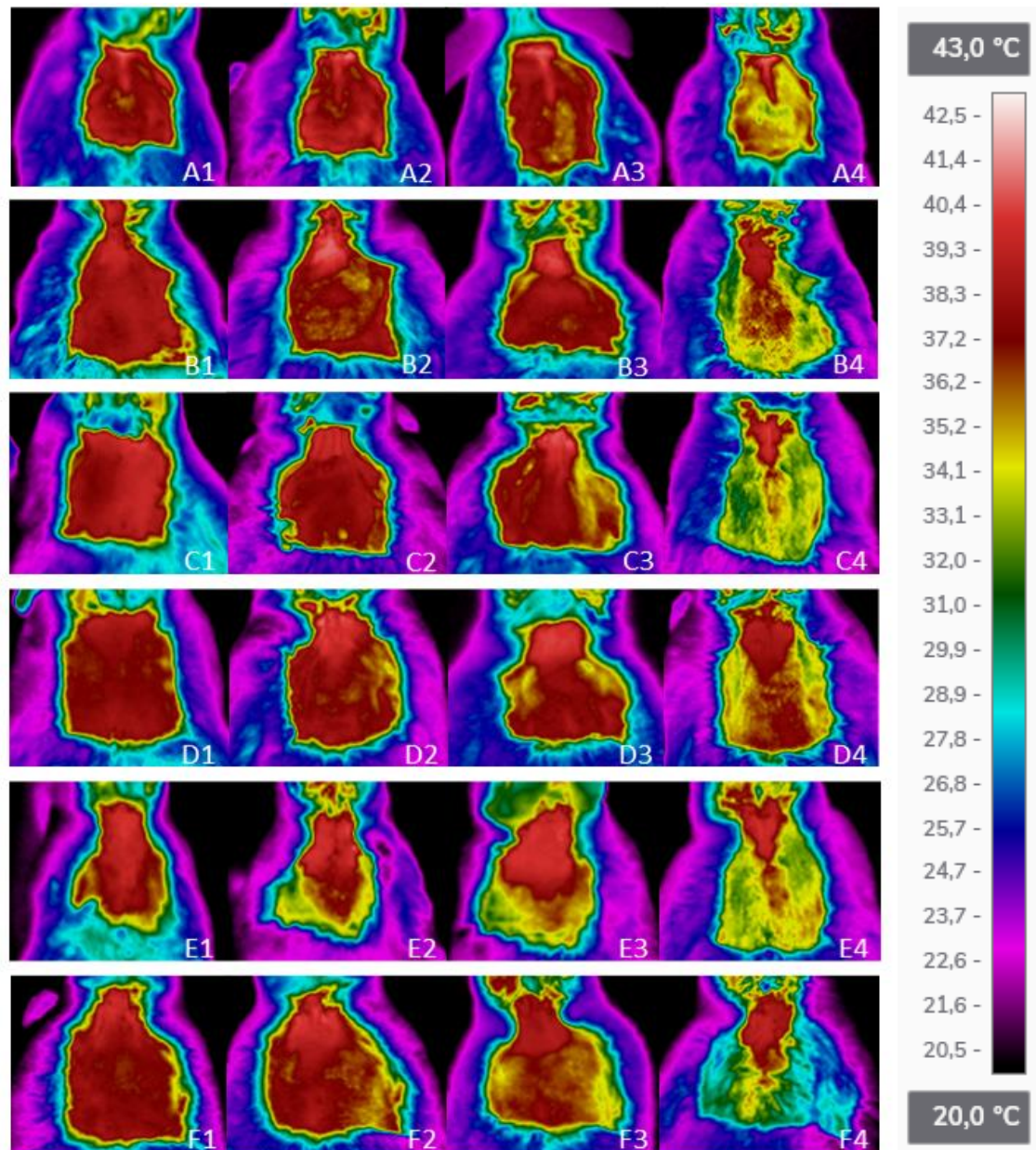
Os animais do grupo CN apresentaram temperatura dentro dos parâmetros normais da espécie durante todo o período experimental, e todos os animais no momento 0h apresentaram temperatura dentro da normalidade para a espécie. Em 6hpi e 18hpi, houve aumento significativo da temperatura dos grupos inoculados com a peçonha de *L. intermedia* e, a partir de 30hpi, todos os animais tiveram diminuição da temperatura devido ao rápido crescimento dos pelos (Figuras 9 e 10). Através do confronto dos dados dos grupos experimentais CP, TO₃, TO₃+pt, Tpt e Tol, não foram observadas diferenças na avaliação termográfica em nenhum dos momentos avaliados.

Figura 9. Comparação entre os valores da média da temperatura dos coelhos de todos os grupos nos momentos antes da inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* (0h) e após 6h (6hpi), 18h (18hpi), 30h (30hpi), 42h (42hpi), 54h (54hpi), 66h (66hpi), 78h (78hpi), 90h (90hpi), 102h (102hpi) e 114h (114hpi).



Hpi=horas pós inoculação; **CN**=controle negativo; **CP**=controle positivo; **TO₃**=tratamento com O₃ subcutâneo; **TO₃+pt**=tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina; **Tpt**=tratamento com pomada de tetraciclina; **Tol**=tratamento com óleo ozonizado. Fonte: elaborada pela autora via GraphPad Prism 9.3.1 (2022).

Figura 10. Imagens termográficas demonstrando a temperatura superficial corporal dos coelhos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, dos grupos controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO₃), tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO₃+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol), nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi, com aumento significativo da temperatura nos momentos 6hpi e 18hpi.



A1, A2, A3 e A4= Grupo CN nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi e 30hpi, respectivamente; B1, B2, B3 e B4= Grupo CP nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi e 30hpi, respectivamente; C1, C2, C3 e C4= Grupo TO₃ nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi e 30hpi, respectivamente; D1, D2, D3 e D4= Grupo TO₃+pt nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi e 30hpi, respectivamente; E1, E2, E3 e E4= Grupo Tpt nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi e 30hpi, respectivamente; F1, F2, F3 e F4= Grupo Tol nos momentos 0h, 6hpi, 18hpi e 30hpi, respectivamente. Hpi= horas pós inoculação. Fonte: elaborada pela autora (2022).

7.4 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA

Todos os animais do experimento apresentaram valores do hemograma e bioquímica sérica dentro do padrão de normalidade para a espécie durante todo o estudo, considerando os valores de referência propostos por Campbell e Elis (2007) e Kaneko et al. (2008) (CAMPBELL; ELLIS, 2007; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$) e entre os momentos (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão do número de eritrócitos, volume globular, concentração de hemoglobina, volume globular médio, concentração de hemoglobina globular média, número de plaquetas e concentração de proteína total plasmática antes (0h), 54h (54hpi) e 126h (126hpi) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, utilizando o teste ANOVA RM para análise entre os momentos, com significância de $p < 0,05$.

Variáveis	Tempo (h)	CN	CP	TO ₃	TO ₃ +pt	Tpt	Tol	p
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	0h	5,45 ± 0,37	5,36 ± 0,70	5,80 ± 0,50	5,83 ± 0,46	5,54 ± 0,34	5,56 ± 0,72	0,694
	54hpi	5,67 ± 0,65	5,40 ± 0,72	5,38 ± 0,47	5,81 ± 0,33	5,64 ± 0,52	5,51 ± 0,75	
	126hpi	5,87 ± 0,46	5,68 ± 0,64	5,89 ± 0,50	6,19 ± 0,15	5,73 ± 0,27	5,73 ± 0,27	
VG (%)	0h	35 ± 2,65	35,6 ± 2,51	37,2 ± 2,68	37,4 ± 2,07	35,6 ± 1,82	35,8 ± 1,64	0,308
	54hpi	36,2 ± 1,92	34,80 ± 1,30	34,8 ± 1,30	36 ± 1,52	34,8 ± 1,92	35 ± 1,87	
	126hpi	39,6 ± 2,5	36,40 ± 5,03	39 ± 3,24	39 ± 2,65	37,2 ± 2,28	38,2 ± 1,10	
Hemoglobina (g/dL)	0h	11,8 ± 0,76	11,8 ± 1,29	12,3 ± 0,56	12,1 ± 0,38	11,5 ± 0,38	11,6 ± 0,93	0,416
	54hpi	12 ± 0,93	11,3 ± 0,90	11,1 ± 0,43	11,9 ± 0,39	11,2 ± 0,32	11,3 ± 0,47	
	126hpi	12,6 ± 1,28	12,3 ± 1,43	12,3 ± 1,28	12,8 ± 1,08	12 ± 0,44	12,1 ± 0,82	
VGM (fL)	0h	64,3 ± 3,49	67 ± 5,56	64,3 ± 2,81	64,3 ± 2,49	64,4 ± 4,76	65 ± 5,52	0,989
	54hpi	64,4 ± 7,20	65,2 ± 7,49	65 ± 4,26	63 ± 1,64	65,2 ± 5,95	64,2 ± 6,59	
	126hpi	66,4 ± 6,95	64,4 ± 8,40	66,2 ± 4,07	63 ± 3,61	65 ± 9,43	66,2 ± 3,05	
CHGM (%)	0h	33,7 ± 3,14	33 ± 1,54	33,1 ± 1,94	32,3 ± 1,37	32,4 ± 1,34	32,3 ± 2,10	0,585
	54hpi	33,2 ± 1,78	32,4 ± 1,45	32 ± 0,89	32,6 ± 0,99	32,3 ± 1,30	32,3 ± 1,19	
	126hpi	33,1 ± 1,22	32,6 ± 1,30	32,4 ± 0,57	32,8 ± 1,11	32,1 ± 0,80	32,4 ± 0,69	
Plaquetas (x10 ³ /μL)	0h	320 ± 61,1	343 ± 73,2	389 ± 82,9	417 ± 28,0	407 ± 110	317 ± 40,5	0,078
	54hpi	373 ± 44,7	497 ± 102	357 ± 164	427 ± 13,0	528 ± 144	405 ± 175	
	126hpi	385 ± 77,9	584 ± 98	576 ± 76,4	484 ± 167	545 ± 108	556 ± 153	
PPT (g/dL)	0h	5,54 ± 0,28	5,66 ± 0,91	5,54 ± 0,70	5,58 ± 0,91	5,46 ± 0,46	5,66 ± 0,54	0,194
	54hpi	5,86 ± 0,21	5,88 ± 0,41	5,88 ± 0,60	5,72 ± 0,47	5,92 ± 0,43	5,90 ± 0,31	
	126hpi	5,55 ± 0,38	5,98 ± 0,44	5,97 ± 0,40	6,02 ± 0,11	5,72 ± 0,42	6,22 ± 0,79	

VG= volume globular; **VGM**= volume globular médio; **CHGM**= concentração de hemoglobina globular média; **PPT**= proteína plasmática total; **Hpi**= horas pós inoculação; **p**= valor de p com nível de significância $p < 0,05$ entre os grupos experimentais. Fonte: elaborada pela autora (2022).

Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão do número total de leucócitos, heterófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos antes (0h), 54h (54hpi) e 126h (126hpi) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, utilizando o teste ANOVA RM para análise entre os momentos, com significância de $p < 0,05$.

Variáveis	Tempo (h)	CN	CP	TO ₃	TO ₃ +pt	Tpt	Tol	<i>p</i>
Leucócitos (/μL)	0h	6.490 ± 1.641	6.994 ± 1.843	6.086 ± 1.600	6.212 ± 1.535	6.980 ± 1.560	6.546 ± 824	0,736
	54hpi	6.250 ± 868	7.436 ± 2.042	7.162 ± 1.934	6.578 ± 1.497	6.748 ± 2.286	6.786 ± 1.943	
	126hpi	6.305 ± 1.446	6.534 ± 1.546	6.808 ± 2.844	6.622 ± 1.909	6.003 ± 1.247	6.928 ± 1.143	
Heterófilos (/μL)	0h	2.085 ± 461	3.109 ± 1.602	2.434 ± 555	1.936 ± 436	2.701 ± 1.194	1.899 ± 634	0,191
	54hpi	2.053 ± 670	3.156 ± 1.645	3.194 ± 990	2.472 ± 799	2.760 ± 1.426	2.959 ± 1.036	
	126hpi	2.298 ± 1.447	3.115 ± 985	2.808 ± 2.244	2.617 ± 490	2.394 ± 1.438	2.621 ± 1.819	
Linfócitos (/μL)	0h	2.435 ± 391	2.190 ± 525	2.566 ± 323	2.688 ± 413	2.049 ± 763	2.632 ± 297	0,422
	54hpi	3.564 ± 561	2.766 ± 735	3.215 ± 650	3.539 ± 908	2.567 ± 437	2.903 ± 429	
	126hpi	3.962 ± 580	3.680 ± 297	3.575 ± 768	3.587 ± 844	3.440 ± 920	3.711 ± 1.043	
Eosinófilos (/μL)	0h	120 ± 230	53,6 ± 65,5	12,2 ± 27,3	33,6 ± 52,9	21,6 ± 30,0	12,2 ± 27,3	0,615
	54hpi	24,8 ± 34	37,4 ± 55,8	37,4 ± 55,8	12,4 ± 27,7	12,4 ± 27,7	24,8 ± 34,0	
	126hpi	46,4 ± 104	0 ± 0	15,4 ± 34,4	30,8 ± 42,2	15,4 ± 34,4	0 ± 0	
Monócitos (/μL)	0h	385 ± 198	194 ± 134	269 ± 119	215 ± 84,8	141 ± 59,5	153 ± 93,8	0,794
	54hpi	249 ± 192	237 ± 92,3	175 ± 81,3	224 ± 94,4	224 ± 195	187 ± 88	
	126hpi	170 ± 149	170 ± 115	186 ± 141	309 ± 219	278 ± 209	340 ± 223	

Hpi= horas pós inoculação; *p*= valor de *p* com nível de significância $p < 0,05$ entre os grupos experimentais. Fonte: elaborada pela autora (2022).

Tabela 3. Valores médios e desvios-padrão da concentração de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e albumina antes (0h), 54h (54hpi) e 126h (126hpi) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, utilizando o teste ANOVA RM para análise entre os momentos, com significância de $p < 0,05$.

Variáveis	Tempo (h)	CN	CP	TO ₃	TO ₃ +pt	Tpt	Tol	<i>p</i>
Ureia (mg/dL)	0h	28,8 ± 4,4	24,0 ± 3,1	24,8 ± 9,6	25,0 ± 4,8	25,2 ± 6,8	23,0 ± 5,6	0,638
	54hpi	23,0 ± 4,4	26,2 ± 4,7	25,2 ± 7,9	26,6 ± 7,0	28,4 ± 5,3	25,8 ± 4,4	
	126hpi	19,8 ± 2,2	25,2 ± 8,4	22,8 ± 5,3	24,2 ± 6,1	28,5 ± 8,1	24,8 ± 5,2	
Creatinina (mg/dL)	0h	0,58 ± 0,14	0,61 ± 0,08	0,67 ± 0,17	0,66 ± 0,11	0,54 ± 0,05	0,65 ± 0,03	0,713
	54hpi	0,68 ± 0,15	0,76 ± 0,15	0,75 ± 0,25	0,74 ± 0,09	0,61 ± 0,08	0,72 ± 0,13	
	126hpi	0,64 ± 0,09	0,62 ± 0,03	0,68 ± 0,09	0,66 ± 0,09	0,61 ± 0,14	0,63 ± 0,04	
AST (UI/L)	0h	15,8 ± 7,8	15,2 ± 5,9	20,6 ± 12,4	22,8 ± 10,4	15,4 ± 4,7	19,6 ± 7,2	0,477
	54hpi	20,4 ± 7,5	17,6 ± 9,4	18,4 ± 8,5	32,8 ± 33,3	21,8 ± 11,7	20,2 ± 12,1	
	126hpi	16,8 ± 7,9	16,8 ± 7,7	18,8 ± 6,5	34,2 ± 44,2	19,3 ± 6,7	17,6 ± 5,1	
ALT (UI/L)	0h	21,4 ± 10,6	20,4 ± 7,7	33,4 ± 20,5	20,8 ± 5,4	31,2 ± 10,8	36,0 ± 8,8	0,950
	54hpi	29,8 ± 9,6	26,8 ± 10,8	33,8 ± 22,3	35,6 ± 24,8	29,0 ± 12,7	30,2 ± 14,3	
	126hpi	27,5 ± 11,4	28,4 ± 10,5	24,6 ± 15,7	39,8 ± 26,9	26,5 ± 14,7	29,6 ± 17,0	
FA (UI/L)	0h	140 ± 45,6	128 ± 94,8	143 ± 44,8	137 ± 28,2	131 ± 50,2	141 ± 46,8	0,983
	54hpi	152 ± 51,9	119 ± 47,1	118 ± 49,3	101 ± 30,7	130 ± 68,5	115 ± 53,2	
	126hpi	147 ± 56,6	118 ± 57,8	92,4 ± 45,1	112 ± 44,3	126 ± 63,3	108 ± 39,1	
Albumina (g/dL)	0h	3,7 ± 0,3	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,4	3,7 ± 0,2	0,714
	54hpi	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,4	3,5 ± 0,3	3,9 ± 0,6	3,8 ± 0,5	3,6 ± 0,6	
	126hpi	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,5	3,6 ± 0,2	3,4 ± 0,1	

AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; FA= fosfatase alcalina; Hpi= horas pós inoculação; *p*= valor de *p* com nível de significância $p < 0,05$ entre os grupos experimentais. Fonte: elaborada pela autora (2022).

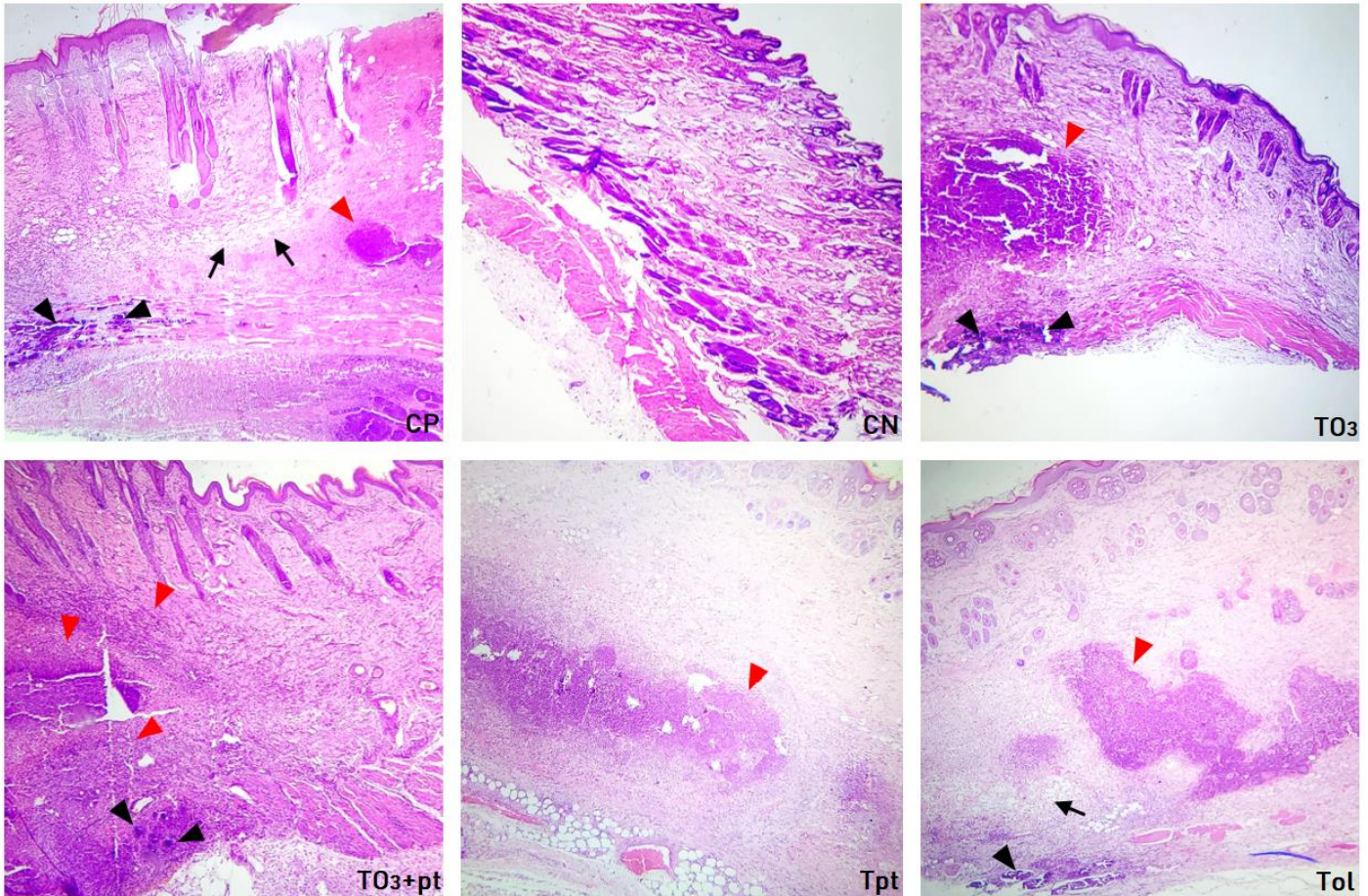
7.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os grupos CP, TO₃, TO₃+pt, Tpt e Tol apresentaram lesões macroscópicas tegumentares como úlcera, crosta e hemorragia, e lesões macroscópicas subcutâneas como cáseo, edema e hemorragia, mas não foram observadas alterações em demais órgãos.

Nos animais do grupo CN, inoculados com PBS estéril, não foram notadas quaisquer alterações histopatológicas, diferindo dos demais grupos ($p < 0,05$) inoculados com a peçonha de *L. intermedia*.

Na histopatologia, foi observado intenso infiltrado inflamatório com predominância de heterófilos em epiderme, derme, hipoderme e musculatura nos animais inoculados com a peçonha de *L. intermedia* (Figura 11). Na epiderme foi visualizado ulceração, acantose, espongiose, hiperqueratose ortoqueratótica e queratinócitos apoptóticos. Na derme havia congestão, hiperemia, abscedação hemorrágica, neovascularização, proliferação fibroblástica, colagenólise e necrose fibrinoide. Na hipoderme e musculatura, havia necrose de adipócitos, rbdomionecrose e mineralização. Não houve diferença entre grupos inoculados com a peçonha de *L. intermedia* e tratados, quando comparado ao grupo controle positivo ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Figura 11. Fotomicrografia cutânea dos coelhos dos grupos controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O3 subcutâneo (TO3), tratamento com O3 subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol). Aumento de 40x.



CP= Derme com edema multifocal e moderado (seta), infiltrado heterofílico, eosinofílico e macrofágico, multifocal a coalescente e moderado (cabeça de seta vermelha), associado com necrose fibrinoide e mineralização (cabeça de seta preta) de camadas musculares superficiais; **CN**= Discreto infiltrado linfoplasmocitário multifocal entre os anexos cutâneos; **TO₃**= Infiltrado heterofílico, eosinofílico e macrofágico em derme, focalmente extenso e moderado a acentuado (cabeça de seta vermelha), associado com necrose fibrinoide na derme e mineralização (cabeça de seta preta) de camadas musculares superficiais; **TO₃+pt**= Infiltrado heterofílico, eosinofílico e macrofágico, focalmente extenso e acentuado (cabeça de seta vermelha), acompanhado por necrose e dissociação de colágeno, e associado com degeneração e mineralização (cabeça de seta preta) de camadas musculares superficiais; **Tpt**= Infiltrado heterofílico, eosinofílico e macrofágico, focalmente extenso e acentuado da derme profunda (cabeça de seta vermelha); **Tol**= infiltrado heterofílico, eosinofílico e macrofágico, multifocal a coalescente, moderado a acentuado (cabeça de seta vermelha), que acompanhada edema multifocal e leve (seta preta), e promove degeneração e mineralização (cabeça de seta preta) de camadas musculares superficiais. Fonte: elaborada pela autora (2022).

Tabela 4. (Continua) Alterações macroscópicas e histopatológicas observadas na epiderme, derme, hipoderme e musculatura em coelhos dos grupos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, classificadas através de escore (0=Ausente; 1=Leve; 2=Leve a moderado; 3=Moderado; 4=Moderado a acentuado; 5=Acentuado), e comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$.

Alterações histopatológicas	Grupos	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	p
Lesões macroscópicas tegumentares					
Úlcera	CP	2	0	3	0,184
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	2	0	2	
Crosta	CP	3	2	3	0,167
	TO ₃	0	0	3	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	2	0	3	
	Tol	2	0	2	
Hemorragia	CP	0	0	0	0,406
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Lesões macroscópicas subcutâneas					
Cáseo	CP	2	1	2	0,748
	TO ₃	2	1	2	
	TO ₃ +pt	1	0	1	
	Tpt	0	0	2	
	Tol	1	1	1	
Edema	CP	0	0	0	0,701
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Hemorragia	CP	2	0	2	0,409
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Mineralização (ranger da faca)	CP	0	0	0	0,406
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	

Tabela 4. (Continua) Alterações macroscópicas e histopatológicas observadas na epiderme, derme, hipoderme e musculatura em coelhos dos grupos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, classificadas através de escore (0=Ausente; 1=Leve; 2=Leve a moderado; 3=Moderado; 4=Moderado a acentuado; 5=Acentuado), e comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$.

Alterações histopatológicas	Grupos	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	<i>p</i>
Lesões na derme					
Congestão e hiperemia	CP	2	1	3	0,384
	TO ₃	3	3	4	
	TO ₃ +pt	2	2	2	
	Tpt	2	1	2	
	Tol	1	1	1	
Intensidade do infiltrado	CP	4	3	4	0,394
	TO ₃	2	2	4	
	TO ₃ +pt	2	2	5	
	Tpt	2	0	3	
	Tol	3	2	4	
Abscedação	CP	0	0	1	0,308
	TO ₃	0	0	1	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Hemorragia	CP	3	0	3	0,292
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	3	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Neovascularização	CP	0	0	0	0,406
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Proliferação fibroblástica	CP	1	1	3	0,217
	TO ₃	1	1	3	
	TO ₃ +pt	3	1	4	
	Tpt	0	0	1	
	Tol	1	1	2	
Colagenólise	CP	0	0	0	0,073
	TO ₃	0	0	1	
	TO ₃ +pt	1	1	3	
	Tpt	0	0	1	
	Tol	3	1	3	
Necrose fibrinoide	CP	0	0	0	0,536
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	

Tabela 4. (Continua) Alterações macroscópicas e histopatológicas observadas na epiderme, derme, hipoderme e musculatura em coelhos dos grupos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, classificadas através de escore (0=Ausente; 1=Leve; 2=Leve a moderado; 3=Moderado; 4=Moderado a acentuado; 5=Acentuado), e comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$.

Alterações histopatológicas	Grupos	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	p
Mineralização	CP	1	0	1	0,348
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	1	
Lesões na epiderme					
Ulceração	CP	0	0	0	0,406
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Intensidade do infiltrado	CP	1	1	2	0,070
	TO ₃	0	0	2	
	TO ₃ +pt	0	0	1	
	Tpt	1	0	1	
	Tol	2	1	3	
Acantose	CP	0	0	0	0,536
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Espongiose	CP	0	0	0	0,406
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Queratinócitos apoptóticos	CP	0	0	0	0,406
	TO ₃	0	0	0	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Hiperqueratose ortoqueratótica	CP	1	0	1	0,183
	TO ₃	1	1	1	
	TO ₃ +pt	3	3	3	
	Tpt	3	1	3	
	Tol	3	3	3	

Tabela 4. (Conclusão) Alterações macroscópicas e histopatológicas observadas na epiderme, derme, hipoderme e musculatura em coelhos dos grupos inoculados com a peçonha de *Loxosceles intermedia*, classificadas através de escore (0=Ausente; 1=Leve; 2=Leve a moderado; 3=Moderado; 4=Moderado a acentuado; 5=Acentuado), e comparação entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$.

Alterações histopatológicas	Grupos	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	<i>p</i>
Lesões na hipoderme e musculatura					
Intensidade do infiltrado	CP	2	2	3	0,181
	TO ₃	4	3	4	
	TO ₃ +pt	1	0	3	
	Tpt	0	0	1	
	Tol	2	2	3	
Necrose de adipócitos	CP	0	0	0	0,936
	TO ₃	0	0	1	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Rabdominecrose	CP	2	1	3	0,148
	TO ₃	3	0	3	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	0	
Mineralização	CP	0	0	0	0,889
	TO ₃	0	0	1	
	TO ₃ +pt	0	0	0	
	Tpt	0	0	0	
	Tol	0	0	1	

Fonte: elaborada pela autora (2022).

Nenhum animal do estudo apresentou alterações histopatológicas em encéfalo, coração, pulmão, fígado, baço, linfonodo, rins, bexiga, estômago, intestino delgado e grosso.

8 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito da ozonioterapia sobre as lesões cutâneas desencadeadas pela peçonha de *L. intermedia*, “aranha-marrom”. Foi demonstrado que coelhos são bons modelos experimentais para a avaliação de feridas dermonecroticas ocasionadas pelo loxoscelismo, pois a inoculação intradérmica da peçonha de *Loxosceles* produziu lesões similares às observadas em humanos (FERRER et al., 2013). Segundo Ribeiro et al. (2019), a dose necrótica mínima de 2,5µg/kg da peçonha de *L. intermedia* induz lesão dermonecrotica em coelhos, que corrobora com o observado neste estudo. Todavia, neste trabalho houve grande

variabilidade em relação a apresentação clínica e ao tamanho das feridas nos animais do mesmo e de diferentes grupos. No presente estudo, nas condições experimentais utilizadas, não foi encontrada diferença na redução do desenvolvimento das lesões dermonecroticas entre os animais tratados com ozonioterapia e pomada de tetraciclina, quando comparados aos animais do grupo controle positivo.

A ozonioterapia é amplamente utilizada na medicina humana e medicina veterinária como agente antioxidante, anti-inflamatório, antifúngico, antibacteriano, imunomodulador e de aumento na oxigenação tecidual (SCIORSCI et al., 2020; TARTARI et al., 2020), no entanto, não há evidências sobre a sua eficácia no tratamento de lesões dermonecroticas causadas por picada de *Loxosceles*. Estudos utilizando ratos como modelo experimental demonstraram efeitos biomoduladores, anti-inflamatórios e de aumento na reparação e regeneração tecidual de feridas cutâneas tratadas com O₃ (PIRES et al., 2021; SANGUANINI et al., 2020). Coelhos infectados experimentalmente por *Microsporum canis* apresentaram melhora clínica significativa após tratamento com óleo ozonizado por 28 dias (DAUD et al., 2011). A aplicação tópica de óleo e água ozonizada em pacientes com infecções de pele causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina foi eficaz, promovendo cura clínica sem o uso concomitante de antibióticos (SONG et al., 2018). A ozonioterapia demonstrou benefícios como adjuvante no tratamento convencional para úlceras do pé diabético por apresentar propriedades antissépticas, aumentar a oxigenação local, induzir a neovascularização e acelerar o processo de reparação tecidual (IZADI et al., 2019; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2005). Todavia, neste estudo, a administração de 15ug/ml de O₃ subcutâneo a cada 12 horas e óleo ozonizado a cada 24 horas, por cinco dias, não gerou diferença entre os animais do grupo controle positivo.

A pomada de tetraciclina 5% está em fase de teste clínico e ainda não é comercializada, porém trabalhos anteriores demonstraram que pode ser um agente terapêutico eficaz para o tratamento do loxoscelismo cutâneo. Paixão-Cavalcante et al. (2006) demonstraram *in vitro* que a SMase D aumenta a expressão e secreção de MMP-2 e MMP-9 e que a tetraciclina é uma droga inibidora de metaloproteinases, podendo controlar os efeitos locais nocivos da peçonha de *Loxosceles* (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2006). Coelhos inoculados com 5ug da peçonha de *L. intermedia* e tratados duas vezes ao dia, durante 48 horas, tiveram redução significativa no desenvolvimento das lesões dermonecroticas quando comparados ao grupo controle (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2007). A administração de tetraciclina também demonstrou ser útil no tratamento do loxoscelismo sistêmico, pois reduziu significativamente a lesão renal em camundongos inoculados via intradérmica com 9,6µg de peçonha de *L. intermedia* (OKAMOTO et al., 2017). Porém, no presente estudo, não foi observado diferença

entre os animais dos grupos TO₃+pt e Tpt quando comparado aos animais do grupo controle positivo.

No loxoscelismo sistêmico, a injúria renal aguda (IRA) decorrente da hemólise intravascular, rabdomiólise ou ação direta da peçonha sobre os rins, é a principal causa de óbito relacionada ao envenenamento pelas aranhas do gênero *Loxosceles* (GREMSKI et al., 2014; LUCIANO et al., 2004). Camundongos inoculados via intravenosa com peçonha de *L. gaucho*, na dose de 240µg/kg, apresentaram lesão renal aguda com queda acentuada na taxa de filtração glomerular, fluxo sanguíneo renal e débito urinário (JUNIOR et al., 2011). As alterações hematológicas e bioquímicas de coelhos inoculados via intradérmica com a peçonha de *L. gaucho*, na dose de 10µg/kg, foram leucopenia e trombocitopenia em 3hpi e 24hpi, seguida de leucocitose neutrofílica e trombocitose em 72hpi e 120hpi, com concentração elevada de fibrinogênio durante todo o período experimental. Todavia, não houve sinais sistêmicos como IRA, hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada, sendo que as alterações encontradas podem estar relacionadas à formação de dermonecrose (TAVARES et al., 2004). A avaliação hematológica neste estudo demonstrou que a dose necrótica mínima da peçonha de *L. intermedia* não causou alterações sistêmicas nos coelhos dos grupos CP, TO₃, TO₃+pt, Tpt e Tol.

A análise histopatológica realizada concluiu que não houve alterações anatomopatológicas sistêmicas em nenhum dos grupos. Macroscopicamente, a pele dos animais inoculados com a peçonha de *L. intermedia* apresentaram úlcera, crosta, hemorragia, cáseo, edema e mineralização (CHATZAKI et al., 2012). Histopatologicamente, havia intenso infiltrado de células polimorfonucleares, com predominância de heterófilos em epiderme, derme, hipoderme e musculatura (OSPEDAL et al., 2002; PEREIRA et al., 2012). A intensa inflamação é um fator que pode contribuir para o desenvolvimento de uma úlcera de difícil cicatrização, como observada em humanos (PEREIRA et al., 2012). Uma das principais alterações teciduais após o acidente por “aranha-marrom” é a diapedese de células inflamatórias no local da picada (OSPEDAL et al., 2002). Os leucócitos polimorfonucleares são considerados os principais contribuintes ao dano tecidual (TAMBOURGI et al., 2005), por isso a maioria dos tratamentos têm buscado reduzir a infiltração dessas células (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2007). As demais alterações histológicas observadas neste estudo, como congestão, hiperemia, hemorragia, neovascularização, colagenólise, mineralização e rabdomionecrose em epiderme, derme, hipoderme e musculatura, também foi descrita em coelhos inoculados com a peçonha de *L. intermedia* e *L. similis* (CHATZAKI et al., 2012; OSPEDAL et al., 2002).

O processo inflamatório cutâneo decorrente do loxoscelismo geralmente se inicia nas seis primeiras horas após a picada da “aranha-marrom”, sendo que os primeiros sinais clínicos

são edema, eritema e áreas hemorrágicas (CACY; MOLD, 1999; PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2007). A termografia é uma técnica não invasiva que detecta a radiação infravermelha emitida pelo corpo, podendo indicar a presença de inflamação pelo aumento da temperatura corporal superficial (CÔRTE; HERNANDEZ, 2016). No presente estudo, todos os grupos inoculados com a peçonha de *L. intermedia* apresentaram aumento significativo da temperatura no local da inoculação em 6hpi e 18hpi. Todavia, a partir de 30hpi, a avaliação termográfica ficou inviável devido ao rápido crescimento de pelo.

Os resultados demonstraram que a aplicação de óleo de girassol ozonizado, ozônio subcutâneo e pomada de tetraciclina após a inoculação da peçonha de *Loxosceles*, não foram capazes de reduzir a lesão dermonecrótica. Mais estudos devem ser realizados para avaliar o efeito anti-inflamatório e cicatricial dessas modalidades terapêuticas por um prazo maior de avaliação que os cinco dias utilizados no presente estudo.

Os coelhos são bons modelos experimentais para estudo de loxoscelismo cutâneo, pois a dose de 2,5µg/ml de peçonha de *L. intermedia* foi capaz de induzir lesão dermonecrótica em todos os animais do estudo, com padrão de lesão semelhante ao relatado em humanos. É de grande interesse médico buscar terapias que interrompam ou retardam o desenvolvimento e progressão da dermonecrose, pois ainda não há tratamento específico para as lesões cutâneas causadas pela picada de *Loxosceles* spp.

9 CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos nesta pesquisa, conclui-se que a dose de 2,5ug/kg da peçonha de *Loxosceles intermedia* causou dermonecrose em todos os animais, mas não gerou alterações sistêmicas. Além disso, o ozônio subcutâneo, o óleo de girassol ozonizado e a pomada de tetraciclina 5% não interferiram no processo inflamatório e de cicatrização nas lesões dermonecroticas induzidas pela peçonha de *L. intermedia* em coelhos, e mais estudos devem ser realizados para a avaliação dessas modalidades terapêuticas no loxoscelismo cutâneo.

10 REFERÊNCIAS

- AL-DALAIN, S. M. et al. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 5, p. 391–396, 2001.
- ANDRADE, R. M. G. et al. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 627–632, 1999.
- ANZOLIN, A. P.; BERTOL, C. D. Ozone therapy as an integrating therapeutic in osteoarthritis treatment: a systematic review. **Brazilian Journal of Pain**, v. 1, n. 2, p. 171–175, 2018.
- ARAÚJO, S. C. et al. Protection against dermonecrotic and lethal activities of *Loxosceles intermedia* spider venom by immunization with a fused recombinant protein. **Toxicon**, v. 41, n. 3, p. 261–267, 2003.
- ARIFIN, W. N.; ZAHIRUDDIN, W. M. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 24, n. 5, p. 101–105, 2017.
- ASAHINA, R.; MAEDA, S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 17–25, 2016.
- BARBARO, K. C. et al. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 972–979, 2010.
- BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 1, p. 3–11, 2004.
- CACY, J.; MOLD, J. W. The clinical characteristics of brown recluse spider bites treated by family physicians. **Journal of Family Practice**, v. 48, n. 7, p. 536–542, 1999.
- CAMPBELL, T.; ELLIS, C. **Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology**. 3. ed. [s.l.] Blackwell Publishing Professional, 2007.
- CARDOSO, C. C. et al. Ozonoterapia como tratamento adjuvante na ferida de pé diabético. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, p. 442–445, 2010.
- CFMV. **Terapias com ozônio e células-tronco são regulamentadas para tratamento de animais**. Disponível em: <<https://www.cfmv.gov.br/terapias-com-ozonio-e-celulas-tronco-sao-regulamentadas-para-tratamento-de-animais>>.
- CHARAN, J.; KANTHARIA, N. . How to calculate sample size in animal studies? **Journal of**

Pharmacology and Pharmacotherapeutics |, v. 4, n. 4, p. 303–306, 2013.

CHATZAKI, M. et al. Cutaneous loxoscelism caused by *Loxosceles similis* venom and neutralization capacity of its specific antivenom. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 21–30, 2012.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 6, p. 1–12, 2017.

CHU, W.-M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222–225, 2013.

CORDEIRO, F. A. et al. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 24, p. 1–14, 2015.

CORREA, M. A. et al. Sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom induces the expression of MMP7 in human keratinocytes: contribution to dermonecrosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–14, 2016.

CÔRTE, A. C. R. E; HERNANDEZ, A. J. Termografia médica infravermelha aplicada à medicina do esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 4, p. 315–319, 2016.

COSTANZO, M. et al. Low ozone concentrations stimulate cytoskeletal organization, mitochondrial activity and nuclear transcription. **European Journal of Histochemistry**, v. 59, n. 2515, p. 129–136, 2015.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

DAUD, F. V. et al. The use of ozonized oil in the treatment of dermatophytosis caused by *Microsporum canis* in rabbits. **Brazilian Journal of Microbiology** , v. 42, p. 274–281, 2011.

DELASOTTA, L. A. et al. Surgical treatment of a brown recluse spider bite: a case study and literature review. **The Journal of Foot & Ankle Surgery**, v. 53, n. 3, p. 320–323, 2014.

DESAI, A. et al. *Loxosceles deserta* spider venom induces NF-kB-dependent chemokine production by endothelial cells. **Clinical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 447–456, 1999.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009.

DRAGULEV, B. et al. Upregulation of IL-6 , IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* Sphingomyelinase D:

insights into spider venom dermonecrosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1264–1266, 2007.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: A clinical review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 66–70, 2011.

FERNÁNDEZ, O. S. L. et al. Ozone oxidative post-conditioning reduces oxidative protein damage in patients with disc hernia. **Neurological Research**, v. 34, n. 1, p. 59–67, 2013.

FERREIRA, K. D. **Cartilagem auricular de bovinos tratada com solução alcalina: avaliação histológica pré-implantação e termográfica pós-implantação na parede abdominal de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2017.

FERRER, V. P. et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1–13, 2013.

FISCHER, M. L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 756–765, 2005.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 179–191, 2003.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, n. 4, p. 261–267, 1992.

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

IZADI, M. et al. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 1, p. 822–825, 2019.

JUNIOR, R. V. L. et al. *Loxosceles gaucho* Venom-Induced Acute Kidney Injury – In Vivo and In Vitro Studies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. 1–5, 2011.

KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008.

LEÓN, O. S. et al. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 4, p. 289–294, 1998.

LOPES, P. H. et al. Clinical aspects, diagnosis and management of *Loxosceles* spider

envenomation: literature and case review. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 7, p. 1461–1477, 2020.

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

MACHADO, L. H. . et al. Necrotic skin lesion in a dog attributed to *Loxosceles* (brown spider) bite: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 572–581, 2009.

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

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. **European Journal of Pharmacology**, v. 523, p. 151–161, 2005.

NGUYEN, N.; PANDEY, M. Loxoscelism: Cutaneous and Hematologic Manifestations. **Advances in Hematology**, v. 9, p. 1–6, 2019.

OKAMOTO, C. K. et al. Tetracycline Reduces Kidney Damage Induced by *Loxosceles* Spider Venom. **Toxins**, v. 9, n. 90, p. 1–16, 2017.

OSPEDAL, K. Z. et al. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 287–294, 2002.

PACE, L. B.; VETTER, R. S. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in small animals. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 4, p. 329–336, 2009.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in HaCaT Keratinocytes Apoptosis Induced by *Loxosceles* Venom Sphingomyelinase D. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 1, n. 126, p. 61–68, 2006.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 6, p. 1410–1418, 2007.

PAULI, I. et al. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123–137, 2006.

PAULI, I. et al. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*).

Toxicon, v. 53, n. 6, p. 660–671, 2009.

PEREIRA, N. . et al. Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 3, p. 277–286, 2012.

PIRES, J. R. et al. Effect of systemic ozone therapy as a biomodulator of tissue regeneration and inflammatory response in rats. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 3, p. 1–11, 2021.

REVUZ, J. et al. **Life-Threatening Dermatoses and Emergencies in Dermatology**. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2009.

RIBEIRO, M. F. et al. Effects of copaiba oil on dermonecrosis induced by *Loxosceles intermedia* venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, p. 1–11, 2019.

ROSUL, M. V.; PATSKAN, B. M. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus. **Wiadomości Lekarskie**, v. 69, n. 1, p. 7–9, 2016.

SANGUANINI, R. C. et al. Ozonized solutions favor the repair of experimentally induced skin wounds in rats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 914–921, 2020.

SCIORSI, R. L. et al. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 240–246, 2020.

SERASANAMBATI, M.; CHILAKAPATI, S. R. Function of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human diseases - A review. **South Indian Journal Of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 368–387, 2016.

SILVA, M. S. DA et al. Cytotoxic and genotoxic effects on human keratinocytes triggered by sphingomyelinase D from *Loxosceles* venom. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 10, p. 3563–3577, 2020.

SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693–709, 2004.

SINAN. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisSC.def>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

SMITH, N. L. et al. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7, n. 3, p. 212–219, 2017.

SOARES, C. D. et al. Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. **Growth Factors**, v. 37, n. 1–2, p. 1–9, 2019.

SONG, M. et al. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, p. 2449–2455, 2018.

SOUZA, A. . et al. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 151–156, 2008.

STRAIN, G. M. et al. Hyperbaric oxygen effects on brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in rabbits. **Toxicon**, v. 29, n. 8, p. 989–996, 1991.

TAMBOURGI, D. V. et al. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, n. 4, p. 725–731, 2005.

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

TAMBOURGI, D. V; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; BERG, C. W. VAN DEN. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113–1119, 2010.

TARTARI, A. P. S. et al. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. **Inflammation**, v. 43, n. 3, p. 985–993, 2020.

TAVARES, F. L. et al. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, n. 10, p. 477–486, 2004.

VALACCHI, G.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 11 . Release of factors from human endothelial cells. **Mediators of Inflammation**, v. 9, n. 6, p. 271–276, 2000.

WONG, R. C.; HUGHES, S. E.; VOORHEES, J. J. Spider bites. **Archives of Dermatology**, v. 123, n. 1, p. 98–104, 1987.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International Immunopharmacology**, v. 56, n. 138, p. 235–241, 2018.