

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

DENILSON ROSALEZ SOARES

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)
APÓS INOCULAÇÃO DA PEÇONHA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles
intermedia*), ASSOCIADO AO TRATAMENTO CONVENCIONAL E
OZONIOTERAPIA**

LAGES

2023

DENILSON ROSALEZ SOARES

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)
APÓS INOCULAÇÃO DA PEÇONHA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles
intermedia*), ASSOCIADO AO TRATAMENTO CONVENCIONAL E
OZONIOTERAPIA**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mere Erika Saito.

Coorientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê.

LAGES

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Soares, Denilson Rosalez

AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) APÓS INOCULAÇÃO DA PEÇONHA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*), ASSOCIADO AO TRATAMENTO CONVENCIONAL E OZONIOTERAPIA. / Denilson Rosalez Soares. -- 2023.

50 p.

Orientadora: Mere Erika Saito

Coorientador: Joandes Henrique Fonteque

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2023.


I. Loxoscelismo. 2. Teste de coagulação. 3. Urinálise. 4. Ozonioterapia. I. Saito, Mere Erika. II. Fonteque, Joandes Henrique . III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

DENILSON ROSALEZ SOARES


**INFLUÊNCIA LOCAL E SISTÊMICA DE DIFERENTES TRATAMENTOS
DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) DA RAÇA NOVA ZELÂNDIA INOCULADOS
COM PEÇONHA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*)**

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:

Documento assinado digitalmente
 MERE ERIKA SAITO
Data: 31/07/2023 10:44:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Mere Erika Saito
Centro de Ciências Agroveterinárias
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Documento assinado digitalmente
 LUCIANA PEREIRA MACHADO
Data: 02/08/2023 15:11:40-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Luciana Pereira Machado
Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Realeza, PR (UFFS)

Documento assinado digitalmente
 JULIETA VOLPATO
Data: 08/08/2023 14:30:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Julieta Volpato
Centro de Ciências Agroveterinárias
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Lages, 13 de julho de 2023

Dedico este trabalho aos meus pais e familiares; a minha esposa e filho, com amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, vida e a oportunidade de estar aqui hoje. A essa força maior que chamamos de destino, agradeço por todos os momentos alegres e tristes, que aconteceram como tinha que ser, e por ter me dado força para continuar em frente nas dificuldades.

Aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Mesmo estando longe sinto a torcida de vocês pelas minhas conquistas. A minha família que de longe torce por mim em todos os passos que dou na minha vida profissional e pessoal.

A minha esposa Carolina pelo apoio e compreensão em todos os momentos, agradeço por ser minha parceira nas loucuras que inventamos, a sua companhia me faz melhor em todos os aspectos, com você a minha vida é mais feliz, amo você. Ao Gabriel meu filho, desde que nasceu me ensina mais do que eu a ele, espero ser o pai que você merece.

A Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), seu corpo docente, direção, administração e todos os funcionários que fazem da UDESC uma Universidade diferente, acolhedora e grandiosa, agradeço pela oportunidade e pelo horizonte que hoje consigo visualizar. Ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), especialmente ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária por estruturarem minha carreira.

A Professora Dr^a. Mere Erika Saito, minha orientadora, pelo suporte, correções e incentivos. Obrigado pelas conversas, conselhos e por todo conhecimento transmitido.

Ao professor Joandes Henrique Fonteque, meu coorientador que contribuiu na execução deste trabalho.

As Professoras presentes na minha banca Dr^a. Julieta Volpato e Dr^a. Luciana Pereira Machado que estão sempre dispostas a expandir a luz da Patologia Clínica Veterinária.

A todos os pós-graduandos que ajudaram nesse projeto idealizado pela Mirian Prevelato de Andrade e Eduardo Lux sempre presentes no HCV. Neste e em vários outros projetos agradeço a participação do Dr. Adson Costa sempre disposto a ajudar e ensinar. E aos alunos que se dedicam ao laboratório de Patologia Clínica Veterinária.

Respeitosamente agradeço aos animais que fizeram parte deste projeto, que tornaram possível chegarmos aos resultados desse trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo da minha carreira meu muito obrigado.

“Sonhos determinam o que você quer. Ação
determina o que você conquista”.

Aldo Novak

RESUMO

SOARES D. R. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) APÓS INOCULAÇÃO DA PEÇONHA DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*), ASSOCIADO AO TRATAMENTO CONVENCIONAL E OZONIOTERAPIA. 2023. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2023.

Os acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles sp.* são chamados de loxoscelismo, representam um problema de saúde pública no Brasil. Dividido em loxoscelismo cutâneo, caracterizado por dermonecrose e loxoscelismo sistêmico, com complicação marcada por hemólise e coagulopatia disseminada, podendo levar à morte. O objetivo deste projeto é avaliar o perfil hematológico, bioquímico, hemostático e urinário em coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), inoculados experimentalmente pela peçonha de *L. intermedia*, em diferentes grupos de animais utilizando tratamentos convencionais e com ozonioterapia. Utilizou-se 30 coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, machos, com peso variando de 2,0 a 3,5kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada, com fornecimento de água e ração comercial *ad libitum*, divididos 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). As lesões foram avaliadas clinicamente a cada 12h, e registradas com fotografias. Para avaliação macroscópica levamos em conta a extensão da lesão (comprimento x largura) com paquímetro e as manifestações de lesão: edema, eritema, hemorragia, formação de halo isquêmico e tecido necrótico. Após punção da veia auricular marginal com o auxílio de cateter 24G, obtivemos amostras de sangue, antes da inoculação (M0), 54h (M1) e 126h (M2) após a inoculação da peçonha para análise hematológica, bioquímica e testes de hemostasia, após a eutanásia dos animais que ocorreu após a última coleta de sangue no M2, por compressão da bexiga obtivemos amostras de urina para realização de urinálise e Relação de proteína:creatinina urinária. Os resultados foram avaliados por programa computacional Sigma Plot for Windows (2009), aplicando-se o teste de análise de variância (ANOVA), sendo que as diferenças observadas foram analisadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$). Os valores encontrados no hemograma, bioquímica, urinálise e RPCU não apresentaram diferença estatística entre os momentos e grupos. Os valores dos testes de coagulação não demonstraram diferença entre momentos e grupos. Não houve alteração sistêmica em coelhos experimentalmente inoculados com a dose de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ da peçonha de *Loxosceles intermedia*, apesar do aparecimento de lesões dermonecroticas, comprovado por ausência de alterações em avaliação hemostática, hematológica, bioquímica clínica e urinálise, assim como da ozonioterapia administrada nas condições do presente estudo. Dessa maneira o presente estudo conclui que Macroscopicamente o ozônio subcutâneo, o óleo de girassol ozonizado e a pomada de tetraciclina 5% não influenciou de maneira significativa o processo inflamatório e de cicatrização nas lesões dermonecroticas induzidas pela peçonha de *L. intermedia* em coelhos.

Palavras-chave: Loxoscelismo; Teste de coagulação; Urinálise; Ozonioterapia.

ABSTRACT

SOARES D. R. LABORATORY EVALUATION OF RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*) AFTER INOCULATION OF BROWN SPIDER VENOM (*Loxosceles intermedia*), ASSOCIATED TO CONVENTIONAL TREATMENT AND OZONIOTHERAPY. 2023. 47f. Dissertation (Master in Animal Science). State University of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2023.

Accidents caused by spiders of the genus *Loxosceles sp.* are called loxoscelism, represent a public health problem in Brazil. Divided into cutaneous loxoscelism, characterized by dermonecrosis and systemic loxoscelism, a complication marked by hemolysis and disseminated coagulopathy, which can lead to death. The objective of this project is to evaluate the hematological, biochemical, hemostatic and urinary profile in New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), experimentally inoculated with *L. intermedia* venom, in different groups of animals using conventional treatments and ozone therapy. Thirty male New Zealand white rabbits, weighing between 2.0 and 3.5 kg, were used. The animals were kept in individual cages, in a temperature-controlled environment, with water and commercial feed ad libitum, divided into six groups of five animals (n=5): positive control (CP), negative control (CN), treatment with subcutaneous O₃ (TO₃), treatment with subcutaneous O₃ and tetracycline ointment (TO₃+pt), treatment with tetracycline ointment (Tpt) and treatment with ozonized sunflower oil (Tol). Lesions were clinically evaluated every 12 hours and recorded with photographs. For the macroscopic evaluation, we considered the extent of the lesion (length x width) with a caliper and the manifestations of the lesion: edema, erythema, hemorrhage, formation of an ischemic halo and necrotic tissue. After puncturing the marginal auricular vein with the aid of a 24G catheter, we obtained samples before inoculation (M₀), 54h (M₁) and 126h (M₂) after inoculation of the venom for hematological, biochemical analysis and hemostasis tests, after euthanasia of the animals. animals that occurred after the last blood collection in M₂, by compressing the bladder we obtained urine samples for urinalysis and urinary protein:creatinine ratio. The results were evaluated using the Sigma Plot for Windows (2009) computer program, applying the variance analysis test (ANOVA), and the observed differences were analyzed using the Tukey test (p<0.05). The values found in blood count, biochemistry, urinalysis and RPCU did not show statistical difference between moments and groups. The values of the coagulation tests showed no difference between moments and groups. There was no systemic alteration in rabbits experimentally inoculated with a dose of 2.5 µg/kg of *Loxosceles intermedia* venom, despite the appearance of dermonecrotic lesions, proven by the absence of alterations in hemostatic, hematological, clinical biochemistry and urinalysis, as well as in the ozone therapy administered under the conditions of the present study. Thus, the present study concludes that Macroscopically, subcutaneous ozone, ozonized sunflower oil and 5% tetracycline ointment did not significantly influence the inflammatory and healing process in dermonecrotic lesions induced by *L. intermedia* venom in rabbits.

Keywords: Loxoscelism; Coagulation test; Urinalysis; Ozone therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Evolução da ferida dermonecrotica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5µg/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo controle positivo (CP). 31
- Figura 2 – Evolução da ferida dermonecrotica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5µg/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com O₃ subcutâneo (TO3).. 31
- Figura 3 – Evolução da ferida dermonecrotica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5µg/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt)... 32
- Figura 4 - Evolução da ferida dermonecrotica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5µg/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com pomada de tetraciclina (Tpt). 32
- Figura 5 - Evolução da ferida dermonecrotica típica em coelhos da raça Nova Zelândia após inoculação de 2,5µg/kg da peçonha de *Loxosceles intermerdia* no grupo tratado com óleo ozonizado (Tol) 33
- Figura 6 - Avaliação da área da lesão em cm² de coelhos, submetidos experimentalmente pela peçonha de *Loxosceles intermedia*, comparando os grupos controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO3), tratamento com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt), com pomada de tetraciclina (Tpt) e com óleo de girassol ozonizado (Tol), com significância de p<0,05..... 33
- Figura 7- Avaliação da Relação proteína creatinina urinária (RPCU) em mg/dL da urinálise, submetidos experimentalmente pela peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os 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), com significância de p<0,05. 41
- Figura 8 - Avaliação dos parâmetros: Tempo de protrombina (TP) e Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), em segundos, após a inoculação da peçonha de *L. intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, Grupos: controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO3), com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e tratamento com óleo de girassol ozonizado (Tol). p= valor de p com nível de significância p<0,05 entre os grupos experimentais. 43
- Figura 9 - Avaliação do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), em segundos, após a inoculação da peçonha de *L. intermedia* em coelhos, comparando os grupos e momentos. Grupos: Controle positivo (CP), controle negativo (CN), tratamento com O₃ subcutâneo (TO3), com O₃ subcutâneo e pomada de tetraciclina (TO3+pt), tratamento com pomada de tetraciclina (Tpt) e com óleo de girassol ozonizado (Tol). p = valor de p nível de significância p<0,05 entre os grupos experimentais..44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios e desvios-padrão do número de eritrócitos, volume globular (VG), concentração de hemoglobina, volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), número de plaquetas e concentração de proteína total plasmática (PPT) antes (0h), 54h (54hpi) e 126h (126hpi) após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, com significância de $p < 0,05$ 36
- 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, comparando os grupos nos diferentes momentos, com significância de $p < 0,05$ 37
- Tabela 3 - Média (desvios-padrão); Mediana (Percentil 25; Percentil 75) da atividade enzimática da aspartatoaminotransferase (AST), aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) gama-glutamil transferase (GGT), creatina quinase (CK), e da concentração de ureia, creatinina, colesterol, triglicérides, glicose, proteínas totais, albumina e globulina, após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, com significância de $p < 0,05$ 39
- Tabela 4 - Média (desvios-padrão); Mediana (Percentil 25; Percentil 75) dos parâmetros da Densidade, Proteína Urinária, Creatinina Urinária e Relação proteína creatinina urinária (RPCU) da urinálise, submetidos experimentalmente pela peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos com significância de $p < 0,05$ 41
- Tabela 5 - Avaliação dos parâmetros: Tempo de protrombina (TP) e Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA), em segundos, após a inoculação da peçonha de *Loxosceles intermedia* em coelhos, comparando os grupos nos diferentes momentos, com significância de $p < 0,05$ 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanino Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CK	Creatinaquinase
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
EDTA	Anticoagulante Ácido Etilenodiaminotetracético
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gama Glutamiltransferase
HPI	Horas Pós Inoculação
IRA	Injúria Renal Aguda
mg	Miligramas
ml	mililitro
µg	micrograma
Kg	Quilograma
O ₃	Gás Ozônio
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PPT	Proteína Plasmática Total
RPCU	Relação proteína creatinina urinaria
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
VG	Volume Globular (VG)
VGM	Volume Globular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 HEMOSTASIA	16
2.1.1 Hemostasia primária	17
2.1.2 Hemostasia secundária	17
2.1.3 Via comum	18
2.2 TESTES DE COAGULAÇÃO	19
2.3 HEMATOLOGIA	19
2.4 BIOQUÍMICA	21
2.5 URINÁLISE	21
2.6 OZONIOTERAPIA	22
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 LOCAL	24
4.2 ANIMAIS	24
4.3 PEÇONHA	25
4.4 GRUPOS	25
4.5 AMOSTRAS	25
4.6 EXAMES LABORATORIAIS	26
4.6.1 Hemograma	26
4.6.2 Hemostasia	26
4.6.3 Bioquímica	27
4.6.4 Urinálise	27
4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
4.8 AVALIAÇÃO DAS LESÕES	29
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS LESÕES	30
5.2 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	34
5.3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	38
5.4 AVALIAÇÃO DA URINA	40
5.5 AVALIAÇÃO DOS TESTES DE COAGULAÇÃO	42
6. CONCLUSÃO	44
7. BIBLIOGRAFIA	45